

Estudi de la interacció de tres complexos de Pt amb proteïnes i oligonucleòtids mitjançant ESI-MS

Mn	Co	Ni	Cu	Zn
Tc	Rh	Pd	Ag	Cd
Re	Os	Pt	Au	Hg

Katia Ghannadzadeh Samper

Directors: Dra. Mercè Capdevila i
Dr. Òscar Palacios

Departament de Química,
Facultat de Ciències

Setembre 2012

Memòria presentada per superar el mòdul d'Iniciació a la Recerca i treball fi de màster corresponent al Màster Universitari en Ciència i Tecnologia Químiques



Katia Ghannadzadeh Samper

Vist i plau, els directors



Dra. Mercè Capdevila



Dr. Òscar Palacios

Bellaterra, 3 de setembre de 2012

Abstract

La reactivitat de tres complexos de Pt, cisplatí, complex **1**, [Pt(dmmba)(aza-N1)(dmso)], complex **2**, i [Pt(dmmba)(N9-9AA)(PPh₃)]⁺, complex **3**; els quals presenten activitat antitumoral, es investigada amb diferents proteïnes i oligonucleòtids mitjançant espectrometria de masses (ESI-TOF MS). L'estudi del cisplatí, **1**, droga molt coneguda i emprada avui en dia pel tractament de molts tipus de càncer, permet comparar la reactivitat dels nous complexos d'estudi, **2** i **3**, els quals presenten un IC₅₀ més baix que el cisplatí en algunes línies de cèl·lules tumorals. Els resultats demostren que el cisplatí presenta una elevada reactivitat amb les proteïnes i oligonucleòtids estudiats, la qual certifica els seus grans efectes secundaris, mentre que el complex **2** i **3**, tot i tenir en comú un mateix lligand quelatant, la dimetilbenzamida, presenten una reactivitat molt diferent. El complex **2** s'uneix a les proteïnes i als oligonucleòtids d'una forma molt particular. La interacció de **2** amb les proteïnes té lloc a partir de la unió del Pt amb els aminoàcids més externs de les proteïnes i de forma específica. Aquesta especificitat permet determinar, en funció del lligand substituït per interaccionar amb la proteïna (dmso o azaindolat), la naturalitat de l'àtom de l'aminoàcid en el qual s'enllaça, si és N-donador o S-donador. El complex **2** interacciona amb els oligonucleòtids, i per extensió amb l'ADN, de forma covalent mitjançant la substitució del lligand azaindolat. Cal destacar que la forta interacció de **2** amb els oligonucleòtids, només s'observa quan aquests estan en solució formant la doble cadena. El complex **3** presenta interaccions covalents molt febles tan amb proteïnes com amb els oligonucleòtids. No obstant, experiments amb fluorescència confirmen la interacció π - π entre **3** i la doble cadena, causada segurament pel seu lligand 9-aminoacridina, responsable, segurament, de l'activitat antitumoral del complex en algunes línies de cèl·lules tumorals.

Agraïments

En primer lloc vull agrair a la Dra Mercè Capdevila l'oportunitat que m'ha donat per a poder col·laborar en el seu grup de recerca, on he après molt i a la vegada he estat molt a gust. Mercè, gràcies per haver-me atès en tot moment i pels bons consells que m'has donat. També agrair al Dr Òscar Palacios, de qui he après molt i m'ha orientat en alguns moments frustrants amb els espectres de masses. Gràcies Òscar per la gran amabilitat amb la que em vas rebre des d'un bon principi i sobretot per tot el que m'has ensenyat.

Gràcies també al Dr José Ruiz i als components del seu grup, Dra Natalia, Dr Venancio, etc, per donar-me els seus complexos per a realitzar els estudis. També agrair a la Dra Silvia Atrian per la síntesi de la proteïna MT1. A la Dra Alba Eustaquio agraeixo la seva paciència amb nosaltres a l'hora de realitzar els experiments amb el masses. Ja sé que a vegades t'hem portat una mica de mal de caps amb tants canvis. Al Dr Roger Bofill, pel seu temps dedicat a ensenyar-me a utilitzar l'espectrofluorímetre, i pels consells en vers aquesta tècnica.

Gràcies a les molt properes i proper doctores. Silvia, per ajudar-me i per ser-hi sempre, m'ha encantat tenir-te a la taula del davant. Cata, a tu pels teus consells i per la teva ajuda incondicional. Joan, pel teu suport i pels bon moments, hem rigut molt. Gràcies companys de dinars. Vosaltres heu fet que la feina al laboratori fos genial. Sou, a més de companys de laboratori, uns grans amics. Gràcies també al Jordi i a la Maribel, pels cafès, les converses i pels riures. Gràcies també a tu, Mireia, que tot i haver coincidit poc per la UAB, també m'has donat consells de la part més bio. I com no, tot i no ser del nostre lab, he d'agrair a l'Alba el suport que sempre m'has donat. Per compartir mútuament les nostres penes i alegries, i sobretot, per ser una gran amiga.

També vull agrair al Lluís tot el suport i l'ajuda que m'ha donat sempre. Pels seus consells, i sobretot, per estar sempre al meu costat. Per estimar-me tant, i preocupar-te tant per mi. Gràcies amor per tot el que fas i has fet per mi. T'estimo! També a l'Emili i la Trini, per donar-me sempre ànims i acollir-me tant bé. Moltes gràcies a tu també Trini, per saber-me escoltar i aconsellar.

Mama, Anna, què us he de dir a vosaltres. Moltes gràcies per haver-me aguantat aquest any amb el màster. Sense vosaltres no ho hauria aconseguit. Gràcies pel vostre suport i per l'ajuda que en tot moment m'heu ofert. Gràcies per recolzar-me sempre i entendre el meu humor dels dies que dormia poc. Us estimo!

*" Tell me and I forget,
teach me and I may remember,
involve me and I learn."*

Benjamin Franklin

Abreujaments

9AA	9-aminoacridina
ADN	Àcid desoxiribonucleic
ARN	Àcid ribonucleic
aza	7-azaindolato- κ M1
cisDDP	Cisplatí
Cit C	Citocrom C
Compl	Complex
Cys	Cisteïna
dmba	<i>N,N</i> -dimetilbenzilamina
dmsO	Dimethylsulfoxid
DS	Doble cadena
EM	Espectrometria de masses
ESI TOF-MS	<i>Electrospray ionization with Time of Flight- Mass spectrometry</i>
His	Histidina
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida d'alta resolució)
HSA	<i>Human serum albumin</i> (Albúmina de sèrum humà)
Mio	Mioglobina
MT	Metal·lotioneïnes
OP1	Oligonucleòtid 1
OP2	Oligonucleòtid 2
Tf	Transferrina

Índex

1.	Introducció	1
1.1.	Càncer.....	1
1.1.1.	Complexos de Platí	1
1.1.2.	Mecanisme d'acció del cisplatí.....	1
1.2.	Espectrometria de Masses: ESI-MS	4
1.2.1.	Tipus d'espectrometries de masses	4
1.2.2.	ESI-TOF MS	5
1.3.	Complexos de Pt amb activitat antitumoral.....	6
2.	Objectius.....	7
3.	Resultats i Discussió	9
3.1.	Interaccions amb proteïnes.....	9
3.1.1.	Interaccions del complex 1, cisDDP	10
3.1.2.	Interaccions del complex 2, [Pt(dmba)(aza-N1)(dmso)]	12
3.1.3.	Interaccions del complex 3, [Pt(dmba)(N9-9AA)(PPh ₃)] ⁺	15
3.2.	Interaccions amb oligonucleòtids	16
3.2.1.	Interaccions del complex 1, CisDDP	17
3.2.2.	Interaccions del complex 2, [Pt(dmba)(aza-N1)(dmso)]	19
3.2.3.	Interaccions del complex 3, [Pt(dmba)(N9-9AA)(PPh ₃)] ⁺	23
4.	Experimental	25
4.1.	Preparació de les mostres	25
4.2.	Espectrometria de masses	25
4.3.	Cromatografia líquida, HPLC	26
4.4.	Fluorimetria	26
5.	Conclusions.....	29
5.1.	Conclusions generals	29
5.2.	Conclusions de la interacció dels complexos	29
6.	Bibliografia.....	31

1. Introducció

1.1. Càncer

D'acord amb l'Institut Nacional del Càncer dels Estats Units, Càncer és el terme emprat per malalties en que les cèl·lules anormals es divideixen i creixen sense control i són capaces d'envair altres teixits.^[1] Aquest fet succeeix com a conseqüència de l'acumulació de múltiples lesions genètiques en l'ADN, ja sigui per herència o adquirides en els gens que prenen part en els processos de proliferació, diferenciació^a i mort cel·lular. També existeixen un conjunt de factors externs (radiacions, productes químics i infeccions víriques) i interns (hormones, aspectes immunitaris i mutacions heretades) que poden causar aquesta malaltia.

Les cèl·lules canceroses es poden propagar pel cos a través de la sang i el sistema limfàtic. No obstant això, hi ha més de cent tipus diferents de càncer, la majoria dels quals es denominen d'acord amb l'òrgan afectat.

El càncer a Catalunya és una de les principals malalties que provoquen mort tan en homes com en dones. No obstant, també és una de les malalties més estudiades, i tot i haver cada dia més casos de persones que pateixen càncer, l'avenç de la ciència a fet que cada dia també es salvin més malalts.

Actualment hi ha molts tractament diferents contra el càncer, ja que, tal i com s'ha mencionat anteriorment, hi ha molts tipus de càncers diferents. Els més emprats són la cirurgia, la quimioteràpia i la radiació.^[2] En quimioteràpia, destaca l'ús de complexos de platí i ruteni com a nuclis de complexos antitumorals.

1.1.1. Complexos de Platí

Els complexos de platí, com cisplatí i carboplatí, han estat els més emprats com a drogues antitumorals des de fa anys.^[3,4,5] El cisplatí va ser el primer a ser sintetitzat al 1844 per Michele Peyrone,^[6] però no va ser emprat en quimioteràpia fins passats cent anys. Al 1971, van ser tractats amb cisplatí els primers pacients, i finalment, al 1978, va ser aprovat per la FDA com la primera droga antitumoral basada en un metall. Actualment, el cisplatí és encara un dels agents de quimioteràpia més utilitzats per determinats tipus de càncer (de bufeta, cervical, de testicle...), i és per aquest motiu que es fa servir com a referència per establir l'activitat de qualsevol agent o possible espècie antitumoral.

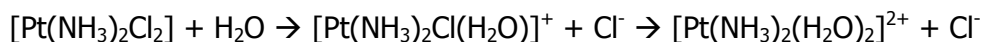
1.1.2. Mecanisme d'acció del cisplatí

El cisplatí, *cis*-diaminodicloroplatí(II), $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, és administrat intravenosament, amb una solució salina estèril, a pacients que pateixen càncer. El mecanisme d'acció del cisplatí no ha estat del tot elucidat, principalment a causa de la gran complexitat i el gran nombre de

^a Procés mitjançant el qual les cèl·lules, els teixits i els òrgans canvien d'activitat, d'estructura i de forma per tal d'efectuar funcions específiques.

mecanismes que entren en joc quan un complex metàl·lic és introduït a l'organisme. Tot i així, hi ha un conjunt d'etapes que estan àmpliament acceptades per la comunitat científica.

Un cop introduït en el malalt, el complex roman intacte, com a complex neutre, mentre la concentració d'ions clorur és alta, bàsicament en entorns extracel·lulars, i pot entrar dins de les cèl·lules per difusió activa o passiva. Una vegada dins, la concentració de clorurs és molt més baixa, i com a conseqüència, la molècula neutra de cisplatí s'hidrolitza, reemplaçant un o els dos lligands clorur per molècules d'aigua, donant lloc així a espècies catióniques:



Les espècies biològicament actives són la monoaqua i la diaqua. Dins la cèl·lula, el cisplatí té un elevat nombre de possibles objectius o *targets*: ADN, ARN, espècies que contenen sofre (com metal·lotioneïnes i glutatió), i mitocondries (Figura 1).^[7,8,9] Els efectes del cisplatí en el mitocondri no es coneixen encara amb certesa avui en dia, en canvi, la interacció amb espècies que contenen sofre és més coneguda i es creu que aquesta és una de les causants de la resistència de les cèl·lules al cisplatí, ja que enllacen el complex i l'expulsen fora de la cèl·lula.^[8,10,11]

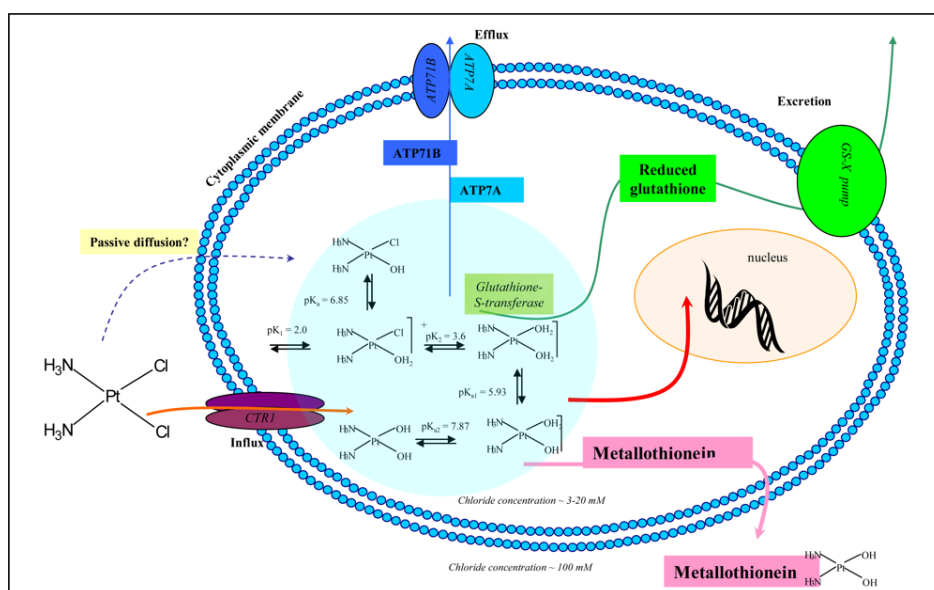


Figura 1. Esquema simplificat de les possibles reaccions dins de la cèl·lula després de l'entrada de cisplatí per difusió activa o passiva. Dins de la cèl·lula, l'aigua complex de cisplatí reacciona amb el DNA, però també pot interaccionar amb altres molècules del citoplasma o del nucli i presentar resistència. Esquema extret de la literatura.^[8]

El cisplatí, com la resta d'antitumoral de platí, pot coordinar-se a molècules d'ADN, concretament a les seves bases nitrogenades. En el cas del cisplatí en concret, es creu que l'espècie catiónica s'uneix principalment al nitrogen en posició 7 (N7) de dues bases nitrogenades puríniques (guanina i adenina) veïnes en la mateixa cadena d'ADN o de cadenes complementàries (Figures 2A i 2B).^[12] Aquest fet provoca que no puguin formar-se ponts d'hidrogen amb bases complementàries, provocant així un plegament anormal de l'hèlix d'ADN (Figura 2C), i com a

conseqüència impedit que tinguin lloc els mecanismes de duplicació, replicació i reparació, donant lloc a la mort cel·lular o apoptosi.^[13,14]

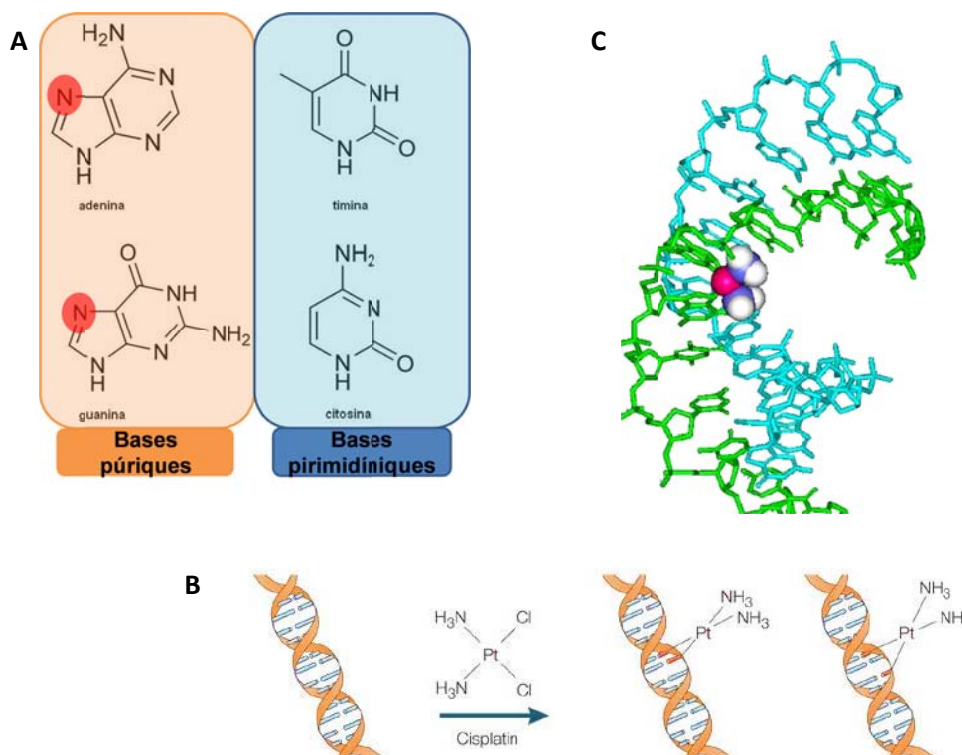


Figura 2. (A) Bases nitrogenades que formen l'ADN. El nitrogen remarcat en vermell correspon al nitrogen en la posició 7 de les bases púriques. (B) Unió del cisplatí a l'ADN, interaccionant amb bases nitrogenades púriques. (C) Estructura cristal·lina on s'observa la interacció del cisplatí amb dues bases de guanina de la mateixa cadena d'ADN, observant-se el plegament inespecífic de l'ADN a causa de l'acció del complex metàl·lic.

El cisplatí, tot i ser una de les drogues antitumorals més emprades a l'actualitat, presenta molts efectes secundaris a causa de la toxicitat que provoca dins del cos. La seva interacció amb les proteïnes juga un paper crucial en els processos de distribució i *uptake* de la droga, ja que les proteïnes són les primeres espècies que es troba al corrent sanguini després de ser administrada intravenosament.^[10] La gran afinitat del Pt(II) pels lligands amb àtoms donadors tous, com el sofre, fa que els complexos de Pt(II) en general tinguin una forta interacció amb alguns dels residus que contenen les proteïnes, bàsicament cisteïnes i histidines. Aquest és un dels motius principals que provoquen que una part important del cisplatí administrat es perdi abans d'arribar a l'ADN de les cèl·lules canceroses, ja que interacciona amb la majoria de les proteïnes que es troba al llarg del camí des de la seva administració fins arribar al seu destí. Aquesta interacció, fa que siguin necessàries dosis molt altes de la droga per a que sigui efectiva. Així mateix, també provoca un seguit d'efectes secundaris en l'organisme, com són el mal funcionament de diversos processos metabòlics i la sobrepressió de mecanismes per tal d'eliminar la toxicitat de la droga, bàsicament provocant l'expressió de glutatió i metal·lotioneïnes. Això fa que determinats tipus de càncer acabin essent resistents al cisplatí, ja que els mecanismes intracel·lulars naturals són prou eficients com per a contrarestar els efectes nocius de la droga.

Així doncs, les noves generacions de compostos antitumorals basats en platí tenen com a objectiu millorar els efectes secundaris del cisplatí, tant pel que fa a la reducció de les dosis requerides del fàrmac com a l'actuació en línies cel·lulars resistents al cisplatí. És per aquest motiu que quan es vol proposar un possible compost antitumoral, l'estudi de la interacció del compost, tant amb ADN com amb proteïnes, és crucial per tal d'entendre el mecanisme d'acció del mateix i així poder sintetitzar drogues molt més efectives.

Entre les diferents metodologies emprades per a l'estudi de la interacció de complexos metàl·lics amb proteïnes o ADN, l'espectrometria de masses molecular (concretament l'ESI-MS) ha estat una de les tècniques més emprades recentment i la que ofereix més possibilitats i una informació més acurada sobre l'esmentada interacció.^[15,16] És per aquest motiu que en la majoria de treballs de la bibliografia recent s'estudia la interacció de complexos metàl·lics amb suposada acció antitumoral mitjançant ESI-MS per tal d'establir la seva reactivitat amb diferents biomolècules,^[15,16] demostrant la importància d'aquesta tècnica per a l'estudi d'aquests tipus d'interaccions.

1.2. Espectrometria de Masses: ESI-MS

L'espectrometria de masses (EM) es basa en la caracterització i detecció, a partir de la seva massa, d'espècies ionitzades en fase gasosa. Es va començar a emprar a principis del segle XX com a tècnica per físics per a l'estudi de l'àtom, i fins a finals dels anys 80, principis dels 90, només s'aplicava a mostres fàcilment volatilitzables. Actualment l'EM és una eina molt important en molts camps de la ciència. La primera persona que va aplicar la ionització per electroesprai a les biomolècules, John B. Fenn, va ser mereixedor del Premi Nobel de Química a l'any 2002.^[17]

Els resultats obtinguts en les mesures es mostren en un espectre on es relaciona la intensitat (o abundància) de les espècies amb la mateixa relació de massa per càrrega (m/z) presents en la mostra per unitat de temps.

1.2.1. Tipus d'espectrometries de masses

A grans trets, existeixen dos tipus d'espectrometries de masses: les moleculars i les atòmiques. L'espectrometria molecular mesura la massa de molècules senceres o parcialment fragmentades, mentre que l'atòmica és més d'anàlisi elemental, mesurant la massa dels diferents elements químics presents en la mostra. Hi ha altres factors que determinen el tipus de compostos que es poden analitzar i que determinaran el tipus d'EM. Aquests tenen a veure amb diferents parts de l'instrument utilitzat, l'espectròmetre de masses, que principalment es caracteritza pel tipus de font d'ionització (part de l'instrument on la mostra s'ionitza per poder entrar a l'equip), i d'analitzador (part de l'instrument que selecciona els ions, en funció de la seva relació m/z , que seran finalment detectats). Les possibles combinacions entre font d'ionització i analitzador

determinen les característiques de l'espectròmetre de masses, i per tant, del tipus de mostra que es podrà analitzar.

Cal esmentar que per a l'estudi de proteïnes, les fonts de ionització més utilitzades són aquelles considerades suaus, que no fragmenten la mostra: la ionització per electroesprai (ESI); i la ionització/desorció de làser assistida per matriu (MALDI). Per altra banda, els analitzadors més habituals són el quadrupol i el de temps de vol (*time of flight*, TOF). Aquest darrer ofereix una elevada resolució quan es treballa en un rang petit de masses, i per tant, és el més utilitzat quan es volen mesurar les mostres acuradament.

Per a la realització d'aquest treball s'ha emprat un equip ESI-TOF MS, localitzat al Servei d'Anàlisi Química (SAQ) de la UAB, i per tant, a continuació es dona una visió general de les característiques d'aquest tipus d'espectròmetre.

1.2.2. ESI-TOF MS

La font d'ionització per electroesprai es emprada per analitzar diferents tipus de mostres com pèptids, proteïnes o aquelles que no són volàtils. La mostra arriba a l'equip mitjançant una xeringa o alguna cromatografia líquida (com HPLC) i en solució, normalment aquosa amb un cert contingut d'algun dissolvent orgànic (com per exemple acetonitril o metanol, 5-15%). La mostra i la solució portadora, la qual conté un gas inert (normalment nitrogen), es barregen just abans d'entrar a l'equip, produint-se un esprai en sortir per l'agulla situada al final del tub per on passa la mostra. Aquest esprai conté gotes més o menys grans, les quals van reduint la seva mida, gràcies a l'evaporació del dissolvent, fins que l'acumulació de càrregues del mateix signe en les gotes petites produeix una explosió de la gota, fet que provoca que les molècules es carreguin o ionitzin (Figura 3). El control del pH o l'addició de substàncies que faciliten un tipus d'ionització (positiva o negativa) permet controlar la ionització de les molècules.

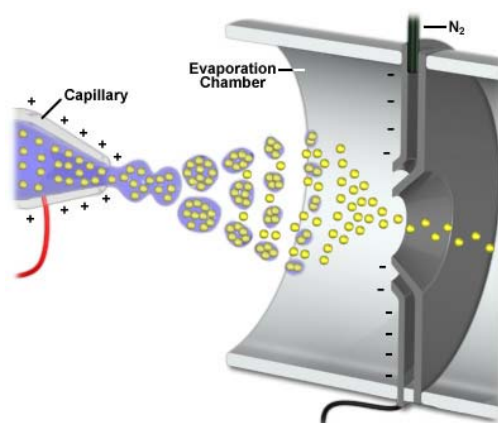


Figura 3. Procés d'ionització per electroesprai (ESI). Al sortir de l'agulla o capil·lar, les gotes d'esprai generades disminueixen la seva mida fins a produir la ionització de la mostra, just abans de l'entrada a l'equip.

L'entrada de la mostra a l'equip es produeix a causa de la diferència de potencial aplicat en tot moment entre l'agulla on es genera l'esprai i la lent d'entrada. Aquesta diferència de potencial

permet la formació d'ions i alhora la selecció d'aquells amb la càrrega desitjada (positiva o negativa).

Aquesta font d'ionització permet analitzar mostres de fins a 200 kDa, i dos dels principals avantatges són que és un mètode suau i que permet la càrrega múltiple dels ions.

Per altra banda, l'analitzador de temps de vol, TOF, permet analitzar mostres de fins a 500 kDa, en teoria sense limitació de m/z i amb un alt rendiment. Els equips d'ESI-MS amb aquest tipus d'analitzador, denominats ESI-TOF MS, pel fet de generar ions multicarregats que poden ser analitzats en un rang de m/z petit, permeten utilitzar l'analitzador TOF en mode d'alta resolució.

1.3. Complexos de Pt amb activitat antitumoral

Els complexos utilitzats en aquest treball són, per una banda, el cisplatí, cis-diaminodicloroplatí(II), altrament anomenat cisDDP, complex **1** (Figura 4A), que, com ja s'ha comentat anteriorment, és un compost antitumoral citostàtic molt estudiat, avui en dia emprat com a compost de referència per comparar l'activitat anticancerígena d'altres compostos.^[18,19] Per altra banda, els complexos **2** i **3** (Figura 4B i 4C) són compostos de Pt(II) sintetitzats i caracteritzats pel grup del Dr. J. Ruiz (Dept. Química Inorgànica, Universidad de Murcia)^[20,21] que presenten activitat antitumoral en diferents línies cel·lulars (cultius cel·lulars de diferents tipus de tumors). Aquests dos complexos tenen en comú un mateix lligand quelatant, la dimetilbenzamida, que dóna una gran estabilitat als complexos a causa de la formació d'un enllaç C-Pt. El complex **2**, [Pt(dmbsa)(aza-N1)(dmso)], on dmbsa = *N,N*-dimetilbenzilamina- $\kappa N, \kappa C$; aza-N1 = 7-azaindolato- $\kappa M1$; dmso = dimethylsulfoxid- κS), conté dos lligands làbils, dmso i azaindolato, que en principi haurien de facilitar la seva interacció covalent amb altres lligands donadors. En canvi, el complex **3**, [Pt(dmbsa)(N9-9AA)(PPh₃)]⁺ (dmbsa = *N,N*-dimetilbenzilamina- $\kappa N, \kappa C$; 9AA = 9-aminoacridina), no presenta cap lligand làbil, però compta amb la presència del lligand aminoacridina, molècula amb reconeguda capacitat per interaccionar selectivament amb l'ADN per intercalació mitjançant interacció de tipus π , produint la detenció del cicle cel·lular i donant lloc a l'apoptosi.^[22,23]

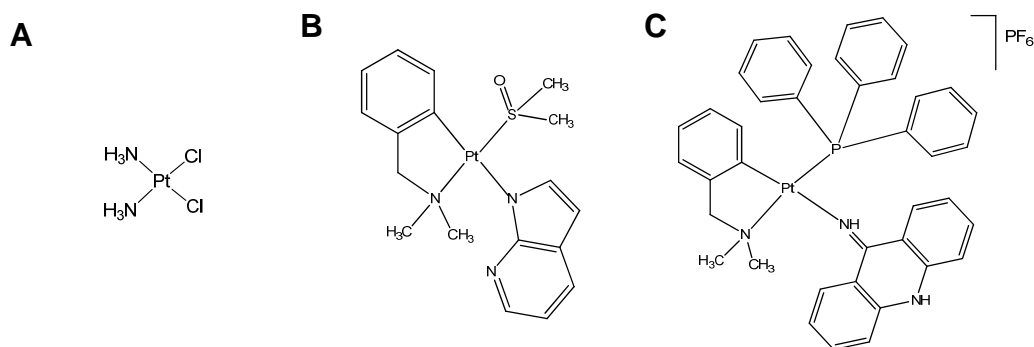


Figura 4. Complexos de Pt estudiats. (A) Complex **1**, cisDDP; (B) Complex **2**; i (C) Complex **3**.

2. Objectius

L'objectiu principal d'aquest treball de recerca realitzat en la Unitat de Química Inorgànica del Departament de Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, és estudiar la interacció de tres complexos que presenten activitat antitumoral amb proteïnes i ADN, mitjançant ESI-TOF MS. Per tal d'aconseguir aquest objectiu, es van establir els següents objectius parcials:

- ✓ Caracterització de les proteïnes i dels oligonucleòtids a estudiar mitjançant ESI-TOF MS per tal d'obtenir els espectres de les espècies inicials.
- ✓ Caracterització dels oligonucleòtids utilitzats com a model d'interacció amb ADN, la doble cadena formada entre ells, mitjançant ESI-TOF MS.
- ✓ Estudi de la interacció dels complexos **1**, **2** i **3** amb les diferents proteïnes escollides, mitjançant ESI-TOF MS.
- ✓ Estudi de la interacció dels complexos **1**, **2** i **3** amb els oligonucleòtids utilitzats, mitjançant ESI-TOF MS.

3. Resultats i Discussió

Les proteïnes escollides per a aquest treball representen aquelles que són majoritàries, entre els milers presents en el cos humà, i que fàcilment poden interaccionar amb els complexos metàl·lics des de la seva introducció al cos pel corrent sanguini, fins a arribar al nucli cel·lular, que és la diana d'aquests compostos citostàtics. Les proteïnes utilitzades han estat: albúmina de sèrum humà i transferrina bovina (ambdues proteïnes majoritàries en el corrent sanguini), mioglobina (com a model d'hemoglobina, proteïna present en els glòbuls vermells), la isoforma MT1 de metal·lotioneïna de mamífer (proteïna intracel·lular que es troba en la forma Zn₇-MT1) i citocrom C (proteïna present als mitocondris). (Veure apartat 3.1. Interaccions amb proteïnes)

Els oligonucleòtids que s'han fet servir en aquest treball (OP1 i OP2) són dues cadenes complementàries, de 10 bases cadascuna, que per incubació donen lloc a la doble cadena corresponent. Un dels oligonucleòtids, OP2, presenta un motiu GG, una diana habitual dels compostos antitumorals de Pt(II).

Els experiments realitzats consisteixen en incubar cadascun dels complexos amb cadascuna de les biomolècules (proteïnes i oligonucleòtids, ja sigui en cadena simple o formant la doble cadena) utilitzant diferents relacions molars biomolècula:Pt (1:1, 1:5, 1:10) durant 24 h i en condicions fisiològiques (37 °C i pH 7-8). Posteriorment, cadascuna d'aquestes solucions s'analitza per ESI-TOF MS per tal de poder observar el nombre d'espècies formades així com la seva naturalesa.

El fet d'emprar el mateix procediment experimental amb els tres complexos permet realitzar una comparació acurada de les seves interaccions en front de les proteïnes i oligonucleòtids estudiats.

3.1. Interaccions amb proteïnes

Com ja s'ha dit anteriorment, s'han estudiat les interaccions dels tres complexos de Pt(II) amb cinc proteïnes: albúmina, transferrina, mioglobina, citocrom C i MT1. Per tal d'estudiar aquestes interaccions, en primer lloc es van analitzar per espectrometria de masses les proteïnes inicials, sense reaccionar, amb la finalitat d'observar els seus pics de massa (diferents estats de càrrega i diverses possibles espècies) en les condicions experimentals utilitzades i es va obtenir, de forma molt precisa, la massa molecular experimental de cadascuna. (Taula 1)

Cal indicar que en tots els casos les masses experimentals estan d'acord amb la massa molecular esperada.(veure Annex, Taula I.) Els espectres de la majoria de proteïnes mostren espècies amb un sol pic, a excepció de l'albúmina i la transferrina, les quals presenten diversos pics freqüentment associats a les formes acetilades o glicosilades.^[24] Per a la mioglobina s'obté una massa molecular de 615 Da superior a l'esperada per a la apoproteïna, el que confirma la presència del grup hemo (616.45 Da).

Taula 1. Pics experimentals obtinguts per ESI-TOF MS d'albumina de sèrum humà (HSA), transferrina, mioglobina, citocrom C i metal·lotioneïna (isoforma MT1 de ratolí). L'error experimental associat a cada massa ha sigut sempre inferior al 0.5%.

Proteïnes metal·lotioneïna	Pes molecular experimental (Da)	Pes molecular teòric (Da)	Localització de la proteïna
HSA	66550	66478	corrent sanguini
Transferrina	78019	77000-80000	corrent sanguini
Mioglobina	17567	17565	glòbuls vermells
Citocrom C	12359	12361	mitocondris
MT1	6606	6606 (Zn ₇ -MT1) 6162 (apo-MT1)	intracel·lular

A continuació es detallen els resultats obtinguts en estudiar la interacció de cadascun dels complexos amb les proteïnes descrites.

3.1.1. Interaccions del complex 1, cisDDP

Els resultats obtinguts amb la incubació del complex 1, cisDDP, amb les proteïnes estudiades mostren que el complex interacciona amb gairebé totes les proteïnes. En els espectres de masses enregistrats (Taula 2) es pot observar, a grans trets, que l'albumina i la transferrina mostren una gran interacció amb 1, i que en canvi, la mioglobina ho fa de forma més moderada, mentre que amb el citocrom C gairebé no presenta interacció.

Quan el complex 1 interacciona amb l'albumina, s'observen pics corresponents a increments de 265.6 (301.1–35.5) i 230.1 (301.1–71.0) Da, deguts a la unió de 1 sense un o dos clorurs inicialment coordinats al Pt, respectivament. Per a una relació 1:1 (proteïna:Pt) s'observen fins a 7 Pt enllaçats a la proteïna. No obstant, l'espècie majoritària conté 4 Pt enllaçats. Tot i això, el número de pics trobats per a relacions Pt:proteïna superiors a 1:1 és força elevat, la qual cosa dificulta la identificació de les diferents espècies. La bibliografia mostra que l'estructura secundària de l'albumina s'altera quan la relació Pt:proteïna és superior a la relació 1:1.^[25]

Pel que fa a la transferrina, s'observa que el nombre d'àtoms de Pt enllaçats a la proteïna també augmenta en augmentar la quantitat d'1 afegida, observant-se fins a 8 complexos enllaçats per a una relació 1:5 (proteïna:Pt) i un pic majoritari corresponent a la unió de 4 complexos. La seva forta interacció dificulta la identificació de pics per a una relació 1:10 (proteïna:Pt).

La mioglobina reacciona de forma moderada amb 1. Per a una relació 1:1 el pic de la proteïna és el majoritari, mentre que per a relacions superiors aquest pic disminueix dràsticament. També s'observa un augment del nombre de complexos enllaçats a la proteïna a mesura que augmenta la relació Pt:proteïna. Així doncs, per a una relació 1:10 (proteïna:Pt), tot i observar-se fins a 6 complexos enllaçats, l'espècie majoritària conté 3 complexos units a la proteïna, un cop desplaçat un dels lligands clorur.

Proteïna	Espectres
----------	-----------

Albúmina		
Transferrina		
Mioglobina		
Citocrom C		

Contràriament a l'observat anteriorment, el citocrom C gairebé no reacciona amb el cisplatí. Per a totes les relacions estudiades, el pic majoritari correspon a la proteïna intacta. Per a una relació 1:10 (proteïna:Pt) s'observen fins a 2 Pt enllaçats a la proteïna. Curiosament, s'ha pogut apreciar que l'espècie que conté un únic àtom de Pt unit a la proteïna ho fa un cop eliminats els dos lligands clorur, mentre que l'espècie que conté dos àtoms de Pt, tot i ser molt minoritària, només requereixen desfer-se d'un dels lligands, actuant com a compostos monodentats. Aquest fet probablement és a causa d'una baixa accessibilitat dels aminoàcids coordinants, que limita la coordinació del centre metàl·lic, i explica així la baixa reactivitat de **1** amb aquesta proteïna.

Pel que fa a la interacció del complex **1** amb MT1, cal esmentar que no s'ha pogut obtenir cap espectre de masses, probablement a causa de que la interacció Pt-S és tan forta que una incubació durant 24 h a 37 °C molt possiblement ha provocat que el complex degradi la proteïna, evitant així que s'observi cap pic significatiu en els espectres de masses. Aquest fet ja havia estat observat en la bibliografia.^[7,8]

En tots els casos estudiats el cisDDP s'uneix a les proteïnes de forma covalent, ja sigui eliminant un o els dos lligands clorur inicials. Aquest fet es pot relacionar d'acord amb l'accessibilitat, i per tant la disposició i nombre, dels aminoàcids coordinants de les proteïnes estudiades. Així doncs, quan hi ha un nombre baix de complexos enllaçats a la proteïna, el complex **1** tendeix a perdre els dos lligands clorur. En canvi, quan el nombre de complexos units és més elevat, es troben espècies amb complex que només ha eliminat un dels dos clorurs. Per tant, els efectes estèrics juguen un paper important en la interacció del complex.

El fet que el complex **1**, cisDDP, presenti una gran interacció amb les proteïnes que es troben en el corrent sanguini sembla ser el responsable de que, després de l'administració d'aquest fàrmac, hi hagi una gran pèrdua del compost al llarg del seu recorregut pel cos, provocant importants efectes secundaris, i de que arribi a interaccionar molt poca quantitat d'aquest complex amb l'ADN de les cèl·lules cancerígenes ^[9,15,26].

3.1.2. Interaccions del complex 2, [Pt(dmba)(aza-N1)(dmso)]

Els resultats obtinguts en estudiar la interacció del complex **2** amb les proteïnes escollides indiquen que **2** interacciona amb totes elles. No obstant, la seva reactivitat és diferent segons el tipus de proteïna. En la Taula 3 es mostren els resultats obtinguts (els espectres de masses enregistrats, corresponents a la relació 1:10 proteïna:Pt, s'inclouen a l'Annex, Figura I.).

Aquests resultats mostren que el complex **2** s'enllaça a les proteïnes bàsicament de tres maneres: eliminant només el lligand dmso; eliminant només el lligand azaindolat; o eliminant els dos lligands a la vegada, dmso i azaindolat. Aquesta interacció depèn principalment de la proteïna amb la qual interacciona el complex **2**.

Taula 3. Resultats de la interacció del complex **2** amb les proteïnes escollides a diferents relacions molars proteïna:complex. Es mostren les espècies observades i la seva abundància relativa (%) respecte a l'espècie amb el pic de masses (ESI-MS) més alt de l'espectre. En negreta es mostren les espècies més abundants, amb major intensitat. El mot "compl" indica l'addició de 524.5 unitats de massa, corresponent al complex sencer, la lletra "D" correspon a una massa de 78.1 unitats, corresponent al lligand dmsó, mentre que "A" indica una de massa de 117.1 unitats, corresponent al lligand azaindolat. Així, la indicació "compl-D" correspon a la massa del complex sense el lligand dmsó, i de manera similar amb les altres combinacions possibles: "compl-D-A", "compl-A".

Relació molar Proteïna:Platí						
Proteïnes		1:1	1:5		1:10	
HSA	HSA	(100 %)	HSA	(100 %)	HSA	(100 %)
	HSA + compl	(15 %)	HSA + compl	(60 %)	HSA + compl	(96 %)
			HSA + 2xcompl	(55 %)	HSA + 2xcompl	(89 %)
Transferrina	Tf	(25 %)	Tf	(13 %)	Tf + 2x(compl -D -A)	(40 %)
	Tf + compl -D -A	(100 %)	Tf + 2x(compl -D -A)	(40 %)	Tf + 3x(compl -D -A)	(70 %)
	Tf + 2x(compl -D -A)	(75 %)	Tf + 3x(compl -D -A)	(98 %)	Tf + 4x(compl -D -A)	(100 %)
	Tf + 3x(compl -D -A)	(35 %)	Tf + 4x(compl -D -A)	(100 %)	Tf + 5x(compl -D -A)	(89 %)
			Tf + 5x(compl -D -A)	(56 %)	Tf + 6x(compl -D -A)	(70 %)
Mioglobina	Mio	(100 %)	Mio	(22 %)	Mio	(20 %)
	Mio + compl -D -A	(29 %)	Mio + compl -D -A	(35 %)	Mio + compl -D -A	(25 %)
	Mio + compl -A	(70 %)	Mio + compl -A	(100 %)	Mio + compl -A	(90 %)
			Mio + 2x(compl -A) -D	(50 %)	Mio + 2x(compl -A) -D	(60 %)
			Mio + 2x(compl -A)	(78 %)	Mio + 2x(compl -A)	(100 %)
			Mio + 3x(compl -A) - 2D	(28 %)	Mio +3x(compl -A) - 2D	(40 %)
			Mio + 3x(compl -A)	(28 %)	Mio + 3x(compl -A)	(48 %)
					Mio + 4x(compl -A) - 3D	(21 %)
Citocrom C	Cit C	(100 %)	Cit C	(60 %)	Cit C	(40 %)
	Cit C + compl -D -A	(40 %)	Cit C + compl -D -A	(100 %)	Cit C + compl -D -A	(100 %)
			Cit C + compl. -D	(24 %)	Cit C + compl -D	(40 %)
			Cit C + 2x(compl -D -A)	(56 %)	Cit C + 2x(compl -D -A)	(78 %)
			Cit C + 2x(compl -D)	(15 %)	Cit C + 2x(compl -D)	(56 %)
			Cit C + 3x(compl -D -A)	(8 %)	Cit C + 3x(compl -D -A)	(28 %)
					Cit C + 3x(compl -D)	(22 %)
					Cit C + 4x(compl -D)	(10 %)
MT1	Zn₇-MT	(100 %)	apo-MT+ 3x(compl -D)+2A	(20 %)	apo-MT + 5x(compl -D)	(100 %)
	Pt ₁ Zn ₇ -MT	(14 %)	apo-MT + 4x(compl -D)+ A	(35 %)		
	Pt ₃ Zn ₂ -MT	(36 %)	apo-MT + 5x(compl -D)	(100 %)		
	Pt ₃ Zn ₃ -MT	(54 %)				
	Pt ₅ -MT	(15 %)				
	Pt ₅ Zn ₁ -MT	(14 %)				
	Pt ₆ Zn ₂ -MT	(14 %)				

En el cas de l'albumina, el complex mostra poca interacció amb la proteïna ja que són poques les espècies amb Pt que es formen, i a més a més, el pic corresponent a la proteïna intacta és majoritari en totes les relacions estudiades. Els pics de la proteïna amb Pt, presenten un augment respecte a la proteïna inicial de 550 ± 25 Da, fet que fa pensar que el complex interacciona amb la proteïna sense eliminar cap dels lligands. Per tal de determinar clarament la naturalesa d'aquesta interacció farien falta més experiments, però és molt probable que pugui atribuir-se al trencament de l'enllaç Pt-NH₃ per unir-se a un aminoàcid de l'albumina, o també per la incorporació del complex en una de les cavitats de la proteïna^b, altrament coneguda per la seva facilitat per transportar diversos tipus de substàncies.^[27]

^b L'albumina és una proteïna molt gran que presenta diferents cavitats a causa de la seva funció de transportar diferents molècules petites.^[27]

Quan el complex **2** interacciona amb la transferrina s'observen pics amb increments de 335 ± 7 unitats de massa, corresponents així a la unió del complex quan ha eliminat els dos lligands, dmsó i azaindolat. A més a més, la quantitat d'espècies i el nombre de complexos enllaçats és proporcional a la quantitat de Pt adicionada. Així doncs, per a una relació 1:10 (proteïna:Pt) s'observen fins a 6 Pt enllaçats i no es detecta la presència de transferrina lliure en solució.

El complex **2** interacciona amb la mioglobina eliminant, majoritàriament, el lligand azaindolat. No obstant, hi ha altres pics minoritaris on també s'observa que a la vegada elimina el dmsó. En canvi, quan el complex interacciona amb el citocrom C, elimina majoritàriament els dos lligands, azaindolat i dmsó, però s'observen pics corresponents a l'eliminació només del dmsó.

En l'estudi de la interacció de **2** amb la Zn_7 -MT1 cal destacar que per a una relació 1:1 no s'observen espècies de proteïna amb Pt força destacades. Així doncs, la proteïna aparentment no s'altera i segueix mantenint els Zn inicials. Ara bé, per a relacions de complex més elevades, 1:5 (proteïna:Pt), el complex elimina únicament el lligand dmsó per enllaçar-se a la proteïna i desplaçant tots els Zn inicials. A més a més, la forma majoritària observada és amb 5 Pt enllaçats.

Una anàlisi global d'aquests resultats tenint en compte les característiques de les proteïnes utilitzades, permet assolir una major comprensió pel que fa a la reactivitat del complex **2** amb les proteïnes. Així doncs, quan el complex reacciona amb proteïnes que únicament contenen histidines (His) en la seva cadena aminoàcida, com és el cas de la mioglobina, el complex elimina el lligand azaindolat per enllaçar-se a un N-donador. En canvi, quan la proteïna només conté cisteïnes (Cys) com a aminoàcids coordinants, com és el cas de la MT1, el complex requereix l'eliminació del lligand dmsó per enllaçar-se a un S-donador. En el cas d'aquelles proteïnes que disposen d'ambdós aminoàcids, His i Cys, el complex pot eliminar els dos lligands per tal d'enllaçar-s'hi, com en el cas de la transferrina o el citocrom C. A més a més, si es compara el nombre de Cys i His presents en les estructures primàries de les proteïnes considerades amb el nombre de Pt enllaçats a les relacions Pt:proteïna més altes, es pot observar que el nombre de Pt enllaçats és sempre inferior al nombre d'aminoàcids coordinants de les proteïnes. Per exemple, en la mioglobina (amb 11 His), com a màxim es troben 4 complexos enllaçats, o en el cas del citocrom C (3 His + 2 Cys) l'espècie majoritària conté únicament un Pt unit. Aquest fet sembla indicar que el complex **2** tendeix a enllaçar-se únicament als aminoàcids més accessibles, ja siguin S- o N-donadors, sense probablement alterar la conformació de la proteïna. Per tant, podem concloure que les espècies formades entre el complex **2** i les proteïnes depenen bàsicament de tres factors: la naturalesa de la proteïna (nombre d'aminoàcids coordinants, bàsicament His i Cys); els aminoàcids coordinants accessibles; i la relació molar proteïna:Pt que s'assagi.

3.1.3. Interaccions del complex **3**, [Pt(dmba)(*N*9-9AA)(PPh₃)]⁺

En analitzar els resultats obtinguts en l'estudi de la interacció del complex **3** amb les proteïnes escollides es pot observar que **3** presenta una baixa interacció amb totes elles. A causa d'aquesta baixa interacció, només es mostren els espectres d'ESI-MS obtinguts en addicionar la major quantitat del complex (relació proteïna:Pt 1:10) (Figura 5).

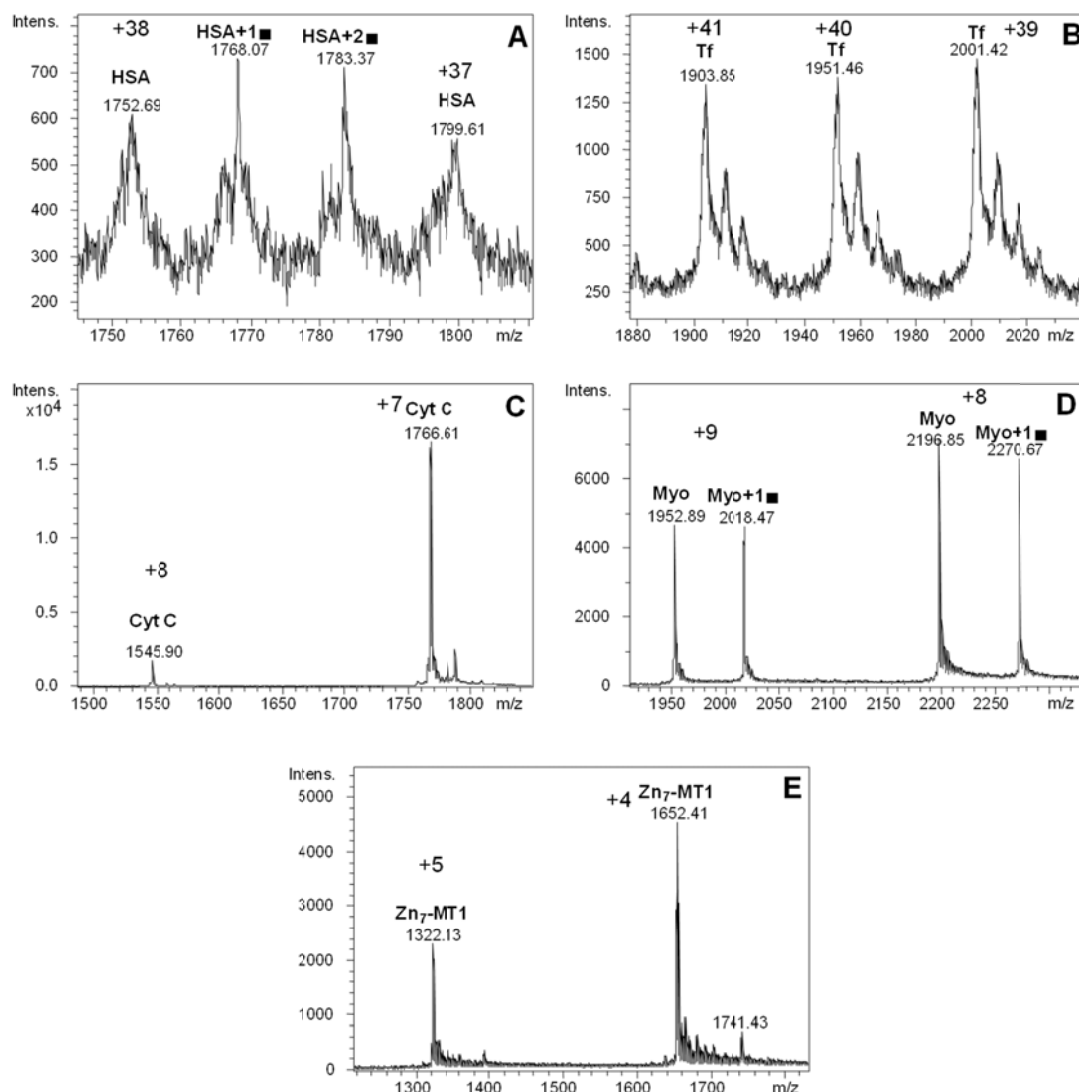


Figura 5. Resultats de la interacció del complex **3** amb les proteïnes estudiades: (A) Albúmina, (B) Transferrina, (C) Citocrom C, (D) Mioglobina i (E) MT1. En tots els casos la relació molar és 1:10 (proteïna:Pt). Es mostren els espectres obtinguts, així com les espècies obtingudes en cada pic. El símbol "■" indica l'addició de 736.6 unitats de massa, corresponent al complex quan ha eliminat el lligand 9-aminoacridina (C₁₃H₁₀N₂) (194.2). La indicació "+1■" correspon a la massa d'un complex sense el lligand 9-aminoacridina.

Els espectres de masses obtinguts després de la incubació de **3** amb transferrina, citocrom C i MT1 no van permetre observar cap pic significatiu que indiqués la interacció del complex amb alguna d'aquestes proteïnes. En els tres casos, per a la relació de proteïna:Pt 1:10 el pic majoritari correspon a la proteïna intacta.

En canvi, el complex **3** sí que interacciona amb albúmina i mioglobina, eliminant en ambdós casos el lligand 9-aminoacridina. No obstant, també s'observa en els espectres de masses, la

presència de proteïna intacta amb un 50 % d'abundància relativa per a la mioglobina i un 30% per a l'albumina i, per tant, cal considerar que hi ha una gran quantitat de complex inalterat. En el cas de l'albumina, s'observen pics corresponents a 1 i 2 complex units, i en la mioglobina apareix un pic amb 1 complex enllaçat.

El fet que **3** interaccioni feblement i amb només algunes de les proteïnes sembla indicar que l'estabilitat del complex de Pt és prou gran com per evitar que, en la majoria del casos, es perdi algun dels lligands que el constitueixen, evitant així que interaccioni fortament amb les proteïnes de manera covalent. Cal destacar que les possible interaccions no covalents entre el complex les proteïnes no es poden observar per ESI-MS, i per tant, seran objecte d'estudis posteriors, mitjançant fluorescència.

3.2. Interaccions amb oligonucleòtids

S'ha estudiat la interacció dels complexos **1**, **2** i **3** amb els oligonucleòtids complementaris seleccionats, tant en forma de cadena simple (OP1 i OP2) com de doble cadena (DS), mitjançant espectrometria de masses. Els dos oligonucleòtids i la DS s'han mesurat per ESI-TOF MS en mode negatiu (Figura 6).

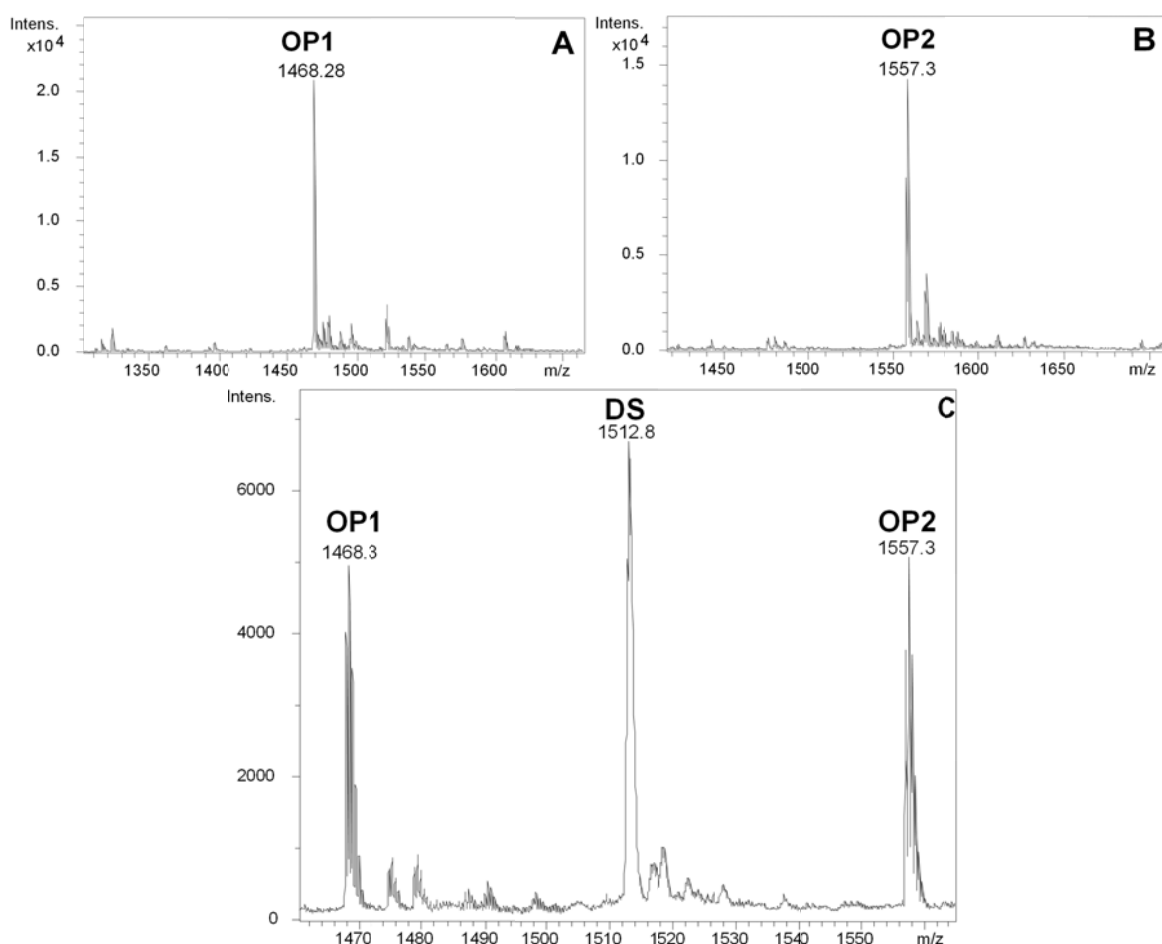


Figura 6. . Espectres d'ESI-TOF MS, en mode negatiu, dels oligonucleòtids, (A) OP1 i (B) OP2, i (C) de la doble cadena, DS.

Els espectres enregistrats dels oligonucleòtids individuals (Figura 6A i 6B) mostren un pic majoritari corresponent a l'esperat (1468.3 m/z OP1; 1557.3 m/z OP2, ambdós amb càrrega -2). També es detecten uns pics de menor intensitat corresponents a impureses. En totes les condicions assajades per formar la doble cadena (veure apartat 4.1. Preparació de les mostres), l'espectre de la DS, de càrrega -4, mostra el pic corresponent a la doble cadena (1512.8 m/z càrrega -4) (Figura 6C) juntament amb els pics corresponents a les cadenes simples, així com un pic (1539.7, càrrega -4) corresponent a l'associació de OP2 amb les espècies minoritàries presents en la solució de l'oligonucleòtid OP1. El fet que la intensitat del pic de DS sigui semblant a la dels pics corresponents a OP1 i OP2, i suposant una sensibilitat similar en ser ionitzats en les condicions d'anàlisi, fa suposar que el rendiment de la hibridació és del 50 %, fet totalment coherent tenint en compte la llargada, només 10 unitats, dels oligonucleòtids. Experiments posteriors (veure la part de HPLC de l'apartat 3.2.3. Interaccions del complex **3**, [Pt(dmba)(N9-9AA)(PPh₃)]PF₆) han demostrat que la DS és estable en les condicions d'ESI-MS emprades, descartant així la possible influència de les condicions utilitzades.

3.2.1. Interaccions del complex **1**, CisDDP

Seguint el procediment experimental detallat a l'apartat 4.1 Preparació de les mostres, s'ha estudiat la interacció de **1** amb la DS després d'incubar ambdós a diferents relacions molars DS:Pt (1:1, 1:5 i 1:10) durant 24 h. Els resultats indiquen que el complex **1** interacciona fortament amb la doble cadena, obtenint-se una gran quantitat de pics en els espectres de masses. En cap de les solucions analitzades es va detectar ni el pic corresponent a la doble cadena ni a les cadenes simples dels oligonucleòtids intactes. A relacions molars més altes, la gran complexitat dels espectres no ha permès identificar cap de les espècies esperades, probablement a causa del trencament de les cadenes. És per aquest motiu que es va decidir dur a terme els experiments a unes relacions molars més baixes per tal de poder estudiar millor la reacció entre **1** i l'ADN. Es van preparar diferents solucions de relacions DS:Pt 1:0.1, 1:0.5 i 1:1 de (Figura 7). En tots els casos s'observen diferents pics que indiquen la interacció de **1** amb els oligonucleòtids on, en la majoria de pics, **1** elimina els dos lligands clorur. A la relació DS:Pt 1:0.1 el pic corresponent a la doble cadena és força intens, però per a una relació 1:0.5 aquest pic, juntament amb els pics corresponents a les dues cadenes simples, disminueixen dràsticament.

Per a les relacions de 1:0.1 i 1:0.5 s'observen pics corresponents a la unió de fins a 2 Pt a la doble cadena. Aquest fet s'observa per l'increment de 230.1 m/z respecte el pic de la DS. No obstant, aquests pics no apareixen a una relació 1:1 degut, segurament, a la desunió de la doble cadena en presència d'un excés de **1**. Així doncs, aquest fet permet proposar que les espècies obtingudes de cadenes simples amb **1** poden provenir tan dels oligonucleòtids que formen la doble cadena, com dels que restaven en solució després de la hibridització.

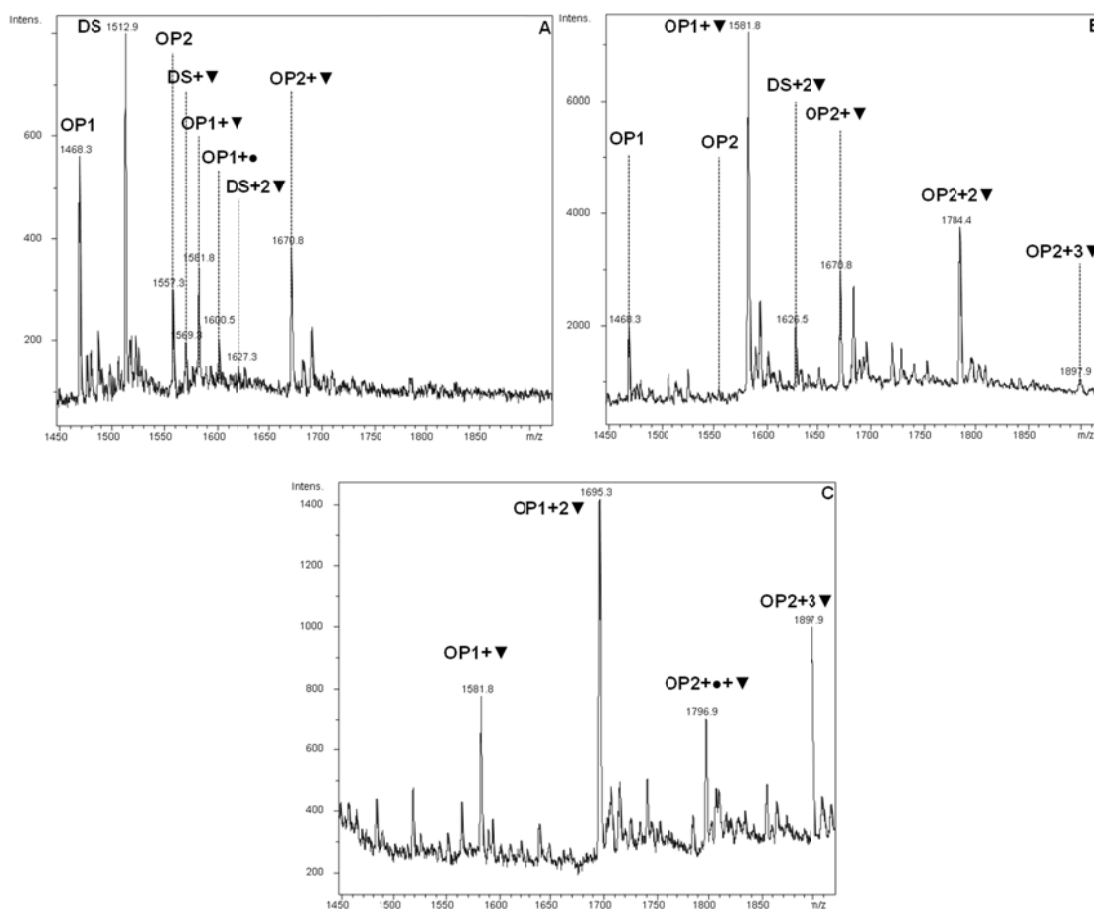


Figura 7. Espectres d'ESI-TOF MS, en mode negatiu, corresponents a la incubació del complex **1** amb la doble cadena a diferents relacions molars DS:Pt: (A) 1:0.1, (B) 1:0.5 i (C) 1:1. Es mostren els espectres obtinguts, així com les espècies obtingudes en cada pic. El símbol "•" indica l'addició de 265.6 unitats de massa, corresponent al complex sense un lligand clorur, i el símbol "▼" correspon a l'addició d'una massa de 230.1 unitats, corresponent al complex sense els dos lligands clorur. Així, la indicació "+•" correspon a la massa d'un complex que ha eliminat un dels lligands clorur, i de manera similar "+2▼" correspon a la massa de 2 complexos sense els dos lligands clorur.

Per tal de determinar si el complex interacciona amb la DS únicament o també amb les cadenes simples presents a la solució inicial, es va incubar durant 24 h a 37 °C el complex **1** amb les dues cadenes per separat, i també amb les dues cadenes en solució a la mateixa concentració però sense formar la DS. Els resultats obtinguts, Figura 8, mostren una gran reactivitat del complex amb les cadenes simples. D'altra banda, cal destacar que el nombre d'àtoms de Pt units a la cadena OP2 és superior al nombre de Pt units a OP1. Aquest fet indica una major reactivitat de **1** vers OP2, probablement per raó d'un major nombre de guanines en la seva composició (5 OP2 vs. 1 OP1), el nucleòtid que, segons la literatura, presenta una major afinitat pel cisplatí.^[13,28]

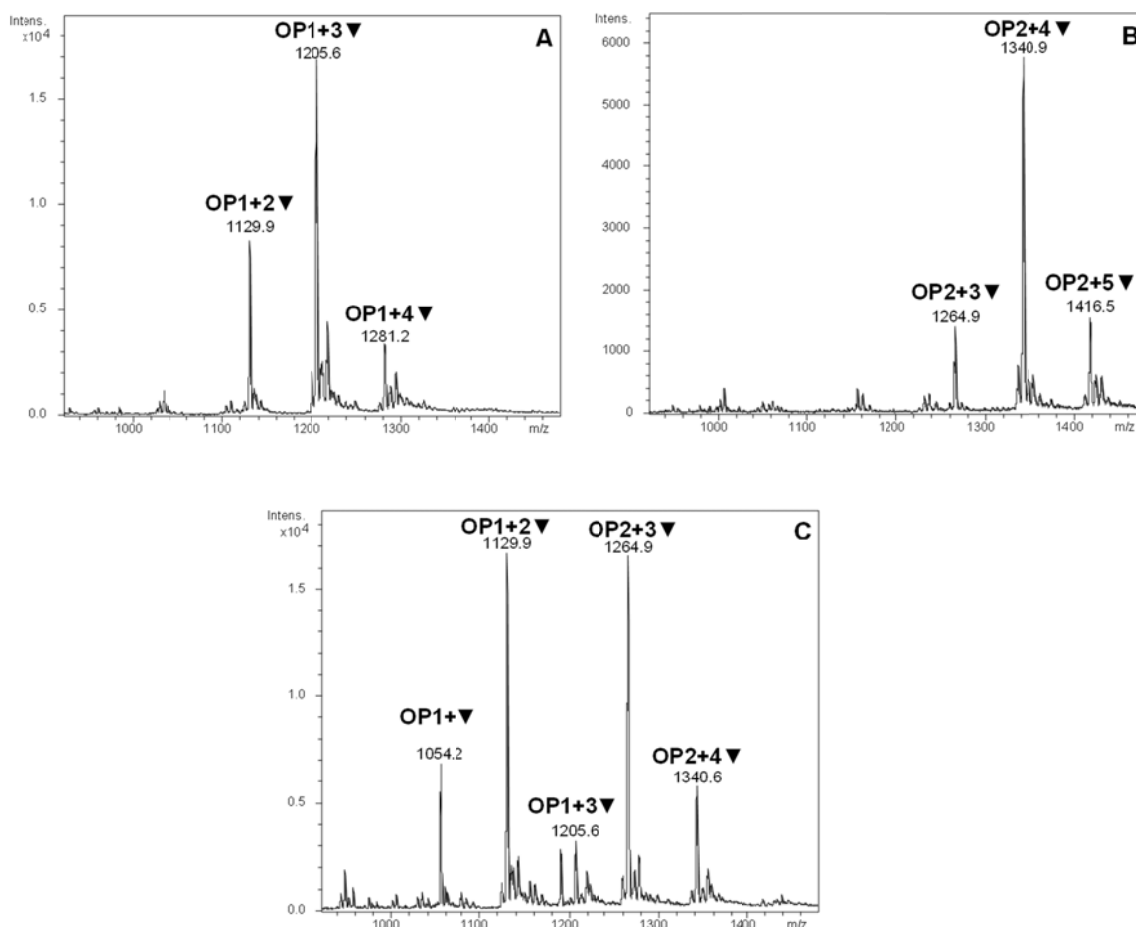


Figura 8. . Espectres d'ESI-TOF MS, en mode negatiu, corresponent a la interacció del complex **1** amb (A) OP1, (B) OP2 i (C) DS. En tots els casos la relació molar oligonucleòtid/DS:Pt ha estat 1:1. Es mostren els espectres obtinguts, així com les espècies obtingudes en cada pic. El símbol "▼" correspon a l'addició d'una massa de 230.1 unitats, corresponent al complex sense els dos lligands clorur. Així, la indicació "+2▼" correspon a la massa de 2 complexos sense els dos lligands clorur.

3.2.2. Interaccions del complex **2**, [Pt(dmab)(aza-N1)(dmsu)]

Els resultats obtinguts en la incubació de **2** i DS, Figura 9, mostren una important interacció entre el complex i la doble cadena, obtenint-se un elevat nombre de pics resultants d'aquesta interacció, que depèn de manera directa de la relació DS:Pt assajada. Cal destacar que en la majoria dels pics observats mostren que **2** elimina majoritàriament el lligand azaindolat per enllaçar-se a DS. Hi ha alguns pics on el complex **2** també elimina el lligand dmsu, però aquest fet només s'observa per a relacions elevades de complex. Tenint en compte la reactivitat observada del complex **2** amb les proteïnes, on l'eliminació del lligand depenia en gran part de l'àtom donador de l'aminoàcid amb el qual reaccionava, l'eliminació del lligand azaindolat suggereix que el Pt s'uneix als grups N-donadors de les bases nitrogenades.

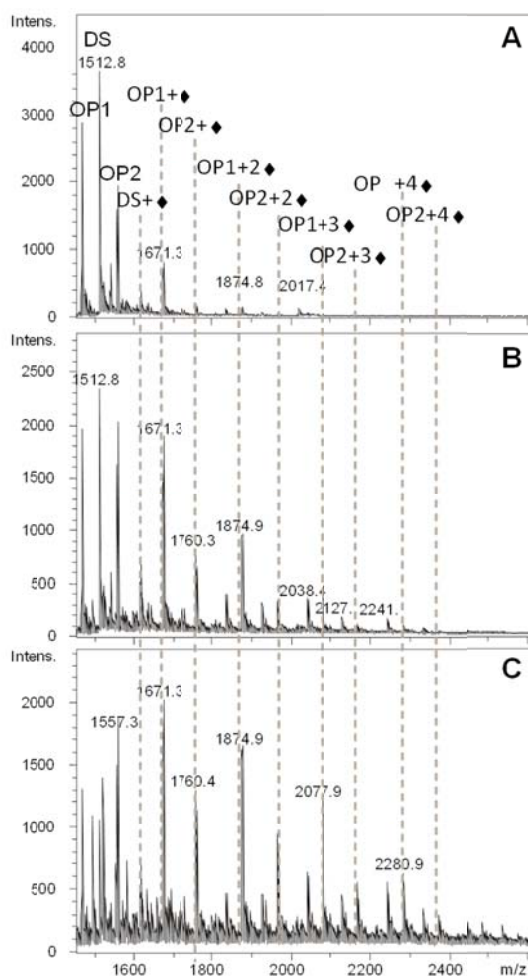


Figura 9. Espectres d'ESI-MS, en mode negatiu, corresponents a la incubació del complex **2** amb DS a diferents relacions molars DS:Pt: (A) 1:1, (B) 1:5 i (C) 1:10. Es mostren els espectres obtinguts, així com les espècies obtingudes en cada pic. El símbol "♦" indica l'addició de 407.4 unitats de massa, corresponent al complex sense el lligand azaindolat. Així, la indicació "+♦" correspon a la massa d'un complex que ha eliminat el lligand azaindolat.

En observar detingudament els espectres de masses enregistrats, es pot apreciar que, per una banda, la intensitat del pic de DS disminueix clarament en augmentar la relació Pt:DS, mentre que els pics corresponents a les cadenes simples no disminueix de manera tant important. Aquest fet suggereix que la interacció pot tenir lloc principalment amb DS, i no pas amb els oligonucleòtids per separat. Per altra banda, la majoria de les espècies detectades que contenen Pt enllaçat són cadenes simples dels oligonucleòtids estudiats (OP1 i OP2), i només hi ha un pic, força minoritari, on es detecta el complex **2** unit a DS. A més a més, a mesura que s'incrementa la relació de Pt:DS s'observa un increment considerable del nombre d'espècies de cadenes simples amb **2**. Aquests resultats poden indicar que, o bé el complex interacciona amb DS i posteriorment la doble cadena es trenca a causa d'aquesta interacció, o bé el complex interacciona tant amb DS com amb les cadenes simples.

Per tal de poder determinar quina de les dues hipòtesis sobre la interacció de **2** amb la DS (que el complex reaccioni amb la DS separant-la, o que el complex reaccioni també amb les cadenes simples presents en solució), es van realitzar dos experiments. El primer, fent reaccionar

2 amb els oligonucleòtids per separat i observant la possible interacció i les espècies que es formaven. I el segon, separant mitjançant HPLC la doble cadena dels oligonucleòtids de cadena simple (OP1 i OP2) presents en solució que no han hibridat per formar la doble cadena, i posteriorment fent reaccionar la fracció que conté únicament la DS amb **2**.

En el primer experiment es va incubar (24 h a 37 °C) cadascun dels oligonucleòtids, OP1 i OP2, amb el complex **2** a una relació molar amb un gran excés del complex, 1:10 (oligonucleòtid:Pt). A continuació es van analitzar per ESI-TOF MS les solucions resultants (Figura 10). Els espectres obtinguts mostren una interacció força pobre del complex amb els oligonucleòtids. En ambdós espectres, els pics corresponents a les espècies intactes, OP1 i OP2, són els més intensos, i només un pic minoritari, amb intensitat relativa d'un 25 % en els dos casos, correspon a una espècie amb un Pt enllaçat. Aquests resultats mostren que la interacció de **2** amb les cadenes simples és molt petita.

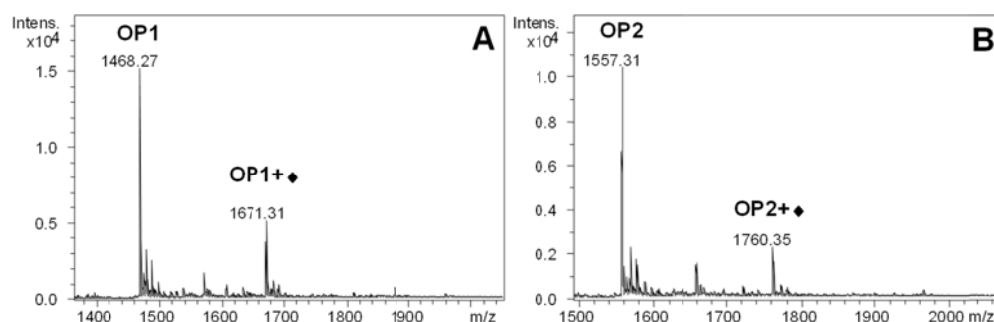


Figura 10. Espectres d'ESI-TOF MS, en mode negatiu, obtinguts després de la incubació del complex **2** amb els dos oligonucleòtids individuals, (A) OP1 i (B) OP2, per a una relació 1:10 oligonucleòtid:Pt. El símbol "♦" indica l'addició de 524.5 unitats de massa, corresponent al complex sense el lligand azaindolat. Així, la indicació "+ ♦" correspon a la massa d'un complex que ha eliminat el lligand azaindolat.

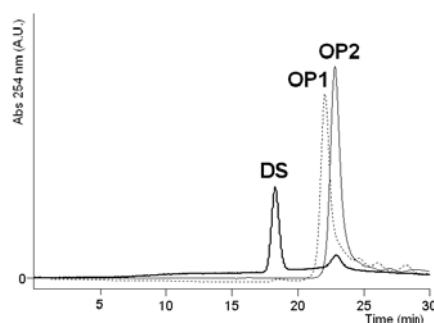


Figura 11. Cromatograma d'HPLC obtingut quan s'injecta una mostra dels oligonucleòtids complementaris OP1 i OP2 prèviament incubada per provocar la formació de la doble cadena. Per a la separació de OP1 i OP2 de DS s'ha utilitzat una columna d'exclusió molecular i s'ha detectat el senyal corresponent a l'absorció a 254 nm.

En el segon experiment, en primer lloc es van hibridar les dues cadenes d'oligonucleòtids, seguin el mateix procediment ja esmentat anteriorment, i, un cop formada la DS, es va separar per HPLC utilitzant una columna d'exclusió molecular. La diferència de massa entre la DS i els dos oligonucleòtids va permetre separar amb èxit la doble cadena (Figura 11) i recollir fraccions que contenien bàsicament DS.

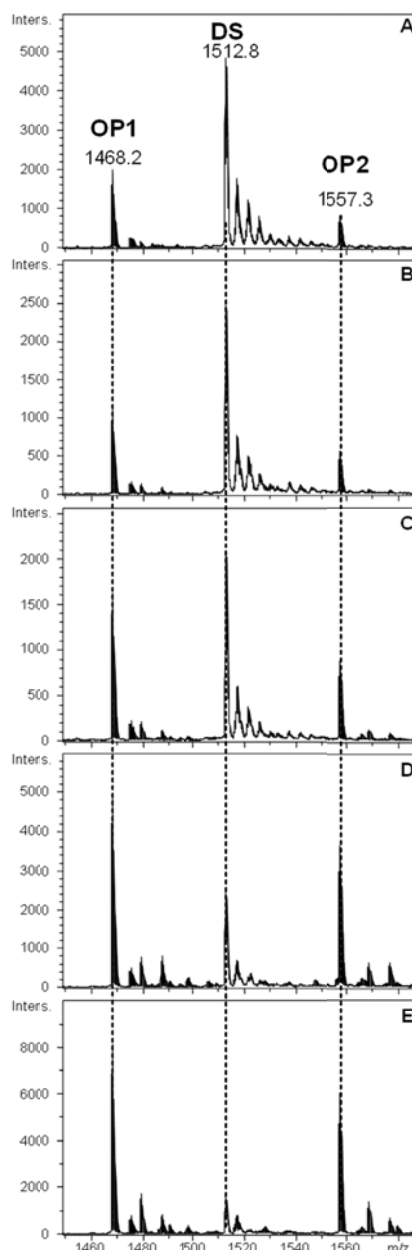


Figura 12. . Espectres d'ESI-TOF MS, en mode negatiu, obtinguts: (A) després de la separació de la fracció de DS i d'incubació d'aquesta amb el complex **2** a relacions molars DS:Pt: (B) 1:1, (C) 1:5, (D) 1:10, i (E) 1:20.

A continuació es van preparar solucions de DS purificada i **2** a diferents relacions DS:Pt (1:1, 1:5, 1:10 i 1:20) i es van incubar de la manera habitual per després analitzar-les mitjançant ESI-MS. A causa de l'alta dilució de les mostres després de la separació cromatogràfica (concentració inferior a 5 μ M), la intensitat dels pics enregistrats era molt baixa, especialment aquest relacionats amb l'enllaç del centre de Pt. No obstant, els pics corresponents a la DS, OP1 i OP2 es van poder observar en tots els casos (Figura 12).

En els espectres obtinguts es pot observar que inicialment (Figura 12A) el pic de DS és clarament majoritari, mentre que hi ha una certa quantitat de OP1 i OP2. A mida que augmenta la

relació Pt:DS (Figures 12B a 12E) es pot apreciar com el pic corresponent a DS disminueix a mida que augmenta la intensitat de les cadenes simples.

Així doncs, el conjunt de resultats obtinguts permeten confirmar que el complex **2** interacciona bàsicament amb la doble cadena provocant la desunió de les seves dues cadenes constitutives.

3.2.3. Interaccions del complex **3**, $[\text{Pt}(\text{dmba})(\text{N9-9AA})(\text{PPh}_3)]^+$

Els resultats obtinguts en la incubació de **3** amb DS (Figura 13) indiquen que el complex **3** mostra una feble interacció amb els oligonucleòtids. En tots els casos, els pics majoritaris detectats corresponen a les espècies inicials (OP1, DS i OP2), independentment de la relació DS:Pt assajada. Només s'observen pics molt minoritaris que mostren que el complex **3** requereix el desplaçament del lligand aminoacridina per interaccionar covalentment amb els oligonucleòtids, de manera similar a l'observat en la seva interacció amb les proteïnes. També s'ha estudiat la interacció de **3** amb els oligonucleòtids per separat, però el resultat ha estat el mateix, no apareixen pics corresponents a espècies amb Pt enllaçat als oligonucleòtids. Per tal de descartar que **3** necessités més temps per a reaccionar, es va realitzar la mateixa reacció deixant el doble de temps d'incubació entre el complex i DS, 48 h, a una relació DS:Pt de 1:10. Els resultats obtinguts no varen mostrar cap diferència significativa respecte els espectres enregistrats al temps d'incubació habitual, 24 h.

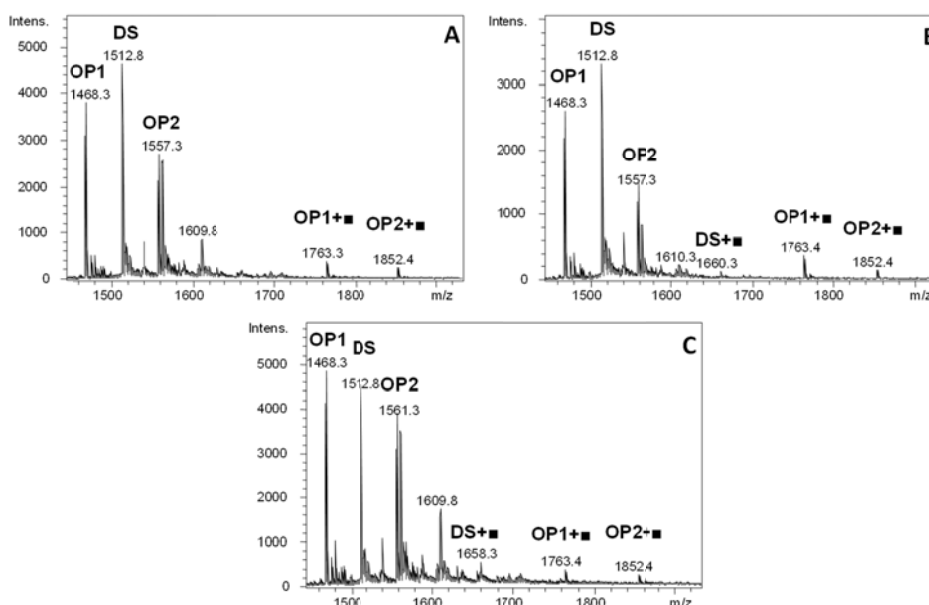


Figura 13. Espectres d'ESI-TOF MS, en mode negatiu, corresponents a la incubació del complex **3** amb la doble cadena a diferents relacions molars DS:Pt: (A) 1:1, (B) 1:5 i (C) 1:10. Es mostren els espectres obtinguts, així com les espècies obtingudes en cada pic. El símbol "■" indica l'addició de 736.6 unitats de massa, corresponent al complex quan ha eliminat el lligand 9-aminoacridina ($\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2$) (194.2). Així, la indicació "+■" correspon a la massa d'un complex sense el lligand 9-aminoacridina.

El conjunt de resultats permet concloure que la interacció de **3** amb els oligonucleòtids, i per tant amb el DNA, no és de tipus covalent. Per tant, la seva citotoxicitat altrament observada^[21] ha de ser deguda a un altra tipus d'interacció no covalent.

Per tal de comprovar que la interacció de **3** amb l'ADN té lloc via interacció π - π , es van incubar conjuntament DS i **3** a diferents relacions molars i es va mesurar la seva fluorescència. L'espectre d'emissió enregistrat presenta dos màxims, un a 345 nm, i l'altre a 460 nm. A causa de que en registrar l'espectre d'emissió del complex **3** es va observar una elevada intensitat d'emissió per sobre de 400 nm, només s'han considerat aquí les bandes observades fins a 400 nm. Així, les variacions en la banda a 345 nm permeten estudiar la interacció entre DS i **3** sense la interferència del complex lliure en solució.

Inicialment es va registrar l'emissió de la DS sense la presència de **3**, observant-se una banda d'elevada intensitat centrada a 345 nm (Figura 14). No obstant, aquesta intensitat va disminuir, fins pràcticament desaparèixer, en afegir un 5% de dmso, probablement a causa d'un efecte de *quenching*. L'augment de la quantitat de **3** (dissolt en dmso) en la solució de DS va provocar increments considerables de la intensitat d'emissió de la banda a 345 nm, fins que el senyal es va saturar per a una relació 1:15 de DS:Pt. Aquest augment d'intensitat de les senyals d'emissió s'atribueix a la interacció π - π entre DS i el lligand aminoacridina del complex **3**. A més a més, tenint en compte el gran efecte de *quenching* provocat per la presència del dmso en solució, l'augment considerable de la intensitat de la banda és indicatiu de que la interacció π - π entre **3** i DS, i per analogia amb el DNA, ha de ser molt forta.

Aquests resultats confirmen que les propietats antitumorals del complex **3** es basen en la interacció π - π entre el complex **3** i l'ADN, probablement mitjançant un mecanisme de π -*stacking*.

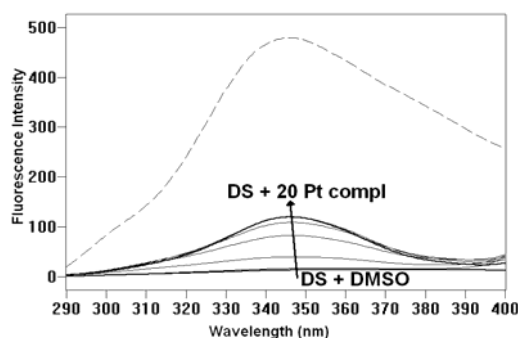


Figura 14. Espectres de fluorescència enregistrats en incubar una solució 10 μ M de DS (amb el complex **3** en dmso). La línia de punts correspon a l'espectre de DS en absència de dmso i les línies contínues corresponen als espectres de DS en presència de 5 % de dmso i a diverses relacions molars DS:Pt: 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 i 1:20.

4. Experimental

4.1. Preparació de les mostres

La majoria de les proteïnes emprades en aquest treball provenen de Sigma-Aldrich: Albúmina de sèrum humà (A8763), Transferrina (T3309), Mioglobina (M6036) i Citocrom C (C3484). La metal·lotioneïna de mamífer (isoforma MT1 de ratolí) va ser produïda, al laboratori de la Dra. Sílvia Atrian (Dept. Genètica, Universitat de Barcelona), mitjançant tècniques d'enginyeria genètica en cèl·lules d'*E. coli* modificades i posteriorment va ser caracteritzada.^[29] Diferents solucions 1 mM de cada proteïna (a excepció de la MT1) van ser preparades en aigua a partir de la corresponent proteïna liofilitzada. La solució de MT1 purificada contenia l'espècie Zn₇-MT1 en una solució de Tris-HCl 50 mM, pH 7.0, i a una concentració 0,275 mM de proteïna. Seguidament, es van preparar solucions de diferents concentracions dels complexos en dmso. A partir d'aquestes solucions, se'n van preparar d'altres de 100 µL per a cada complex amb les diferents proteïnes, que contenien: proteïna en concentració 100 µM, obtinguda a partir de barrejar el volum apropiat de cada solució de proteïna preparada prèviament, la quantitat de complex segons la relació proteïna:Pt (1:0.1, 1:0.5, 1:1, 1:5, 1:10) en referència a la proteïna considerada i el volum necessari d'una solució tamponada amb bicarbonat d'amoni per tal d'aconseguir una concentració de tampó 25 mM a pH 7.0. A continuació es van incubar les diferents solucions a 37 °C durant 24 hores en un bany d'aigua sota agitació.

Les cadenes simples d'oligonucleòtids complementaris emprats en aquest treball, OP1 (5'-CACTTCCGCT-3') i OP2 (5'-AGCGGAAGTG-3'), van ser adquirits de Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg, Alemanya). Per tal d'obtenir la corresponent doble cadena (DS) d'ambdós oligonucleòtids, es van mesclar quantitats equimolars de les solucions de concentració 50 µM de OP1 i OP2 en tampó bicarbonat amònic 25 mM, pH 7.0. La solució va ser incubada a 70 °C durant 2 h i seguidament es va deixar refredar lentament a temperatura ambient. Es van preparar mostres de 100 µL que contenien el volum necessari per obtenir 20 µM de DS i el volum de complex segons la relació DS:Pt (1:1, 1:5 i 1:10 o 1:20) a considerar. Les solucions així preparades van ser incubades a 37 °C durant 24 h en un bany d'aigua sota agitació.

Seguidament, totes les mostres es van diluir adequadament abans de ser analitzades per masses per tal d'obtenir una millor relació senyal/soroll en els espectres enregistrats a les condicions de treball escollides.

4.2. Espectrometria de masses

La determinació de les espècies presents en les solucions analitzades es va dur a terme mitjançant espectrometria de masses amb ionització per electroesprai (ESI-MS) emprant un instrument Micro Tof-Q (Brucker Daltonics GmbH, Bremen, Alemanya) equipat amb un analitzador

de temps de vol (ESI-TOF MS) calibrat amb NaI (200 ppm NaI en una mescla 1:1 de H₂O:isopropanol), acoblat a una bomba d'HPLC de la Sèrie 1100 (Agilent Technologies) equipat amb automostrejador, ambdós controlats pel programari Compass.

Les interaccions dels complexos amb proteïnes van ser analitzades en mode positiu sota les condicions experimentals següents: 20 µL de mostra van ser injectats a 40 µL·min⁻¹; el voltatge entre el capil·lar i l'entrada a l'equip (*capillary-counterelectrode*) va ser de 4.5 kV; la temperatura de desolvatació va ser de 100 °C; el flux del gas d'assecamment és de 6 L·min⁻¹. Els espectres es van enregistrar des de 800 a 2500 m/z. La fase mòbil va consistir en una mescla 85:15 de d'acetat d'amoni 15 mM a pH 7.0 i acetonitril.

Les interaccions dels complexos amb oligonucleòtids van ser analitzades en mode negatiu seguint les següents condicions experimentals: 10 µL de mostra van ser injectats a 40 µL·min⁻¹; el voltatge entre el capil·lar i l'entrada a l'equip (*capillary-counterelectrode*) va ser de 3.9 kV; la temperatura de desolvatació va ser de 100 °C; el flux del gas d'assecamment és de 6 L·min⁻¹. Els espectres van ser enregistrats des de 800 a 2500 m/z. La fase mòbil va consistir en una mescla de 90:10 d'acetat d'amoni 15 mM a pH 7.0 i acetonitril.

Totes les mostres van ser injectades al menys per duplicat per assegurar la seva reproductibilitat.

4.3. Cromatografia líquida, HPLC

La separació cromatogràfica dels oligonucleòtids es va dur a terme mitjançant una columna d'exclusió molecular, Superdex Peptide 10/300 GL (GE Healthcare), amb un rang d'exclusió entre 100 i 7000 Da, connectada a una bomba d'HPLC, Sèrie 1200 (Agilent Technologies), equipada amb un automostrejador i un detector de diode array, controlat tot pel programa Compass. Diverses al·lòtotes de 100 µL de la mostra van ser injectades en la columna i eluïdes amb una solució tampó de bicarbonat d'amoni 50 mM i pH 7.5, amb un flux de 550 µL min⁻¹. A la sortida de la columna, l'absorbància de l'eluat va ser enregistrada a 210, 254, i 280 nm. Cada pic detectat (DS, OP1 i OP2) va ser recollit separatament i les fraccions corresponents es van homogeneïtzar abans d'incubar amb el complex de Pt(II).

4.4. Fluorimetria

Per a les mesures de fluorescència dutes a terme amb el complex **3**, es va utilitzar un instrument LS 55 50 Hz Fluorescence Spectrometer (Perkin Elmer; Regne Unit), emprant una cubeta de quars d'1 cm i a la temperatura constant de 25 °C, termostàticament controlada per un bany d'aigua. A una solució de 10 µM de la doble cadena d'oligonucleòtids prèviament incubada (DS), en una solució tampó d'acetat d'amoni 25 mM a pH 7.5, es van addicionar quantitats creixents del complex **3** fins assolir les relacions molars DS:Pt 1:1, 1:5, 1:10, 1:15 i 1:20,

mantenint una concentració del 5 % de dmso. Per cadascuna de les addicions, abans de mesurar l'espectre d'emissió, la mescla es va incubar a 40 °C durant 2 h. Després de diversos assajos amb diferents condicions experimentals, les condicions òptimes d'anàlisi van resultar ser les següents: la mostra va ser excitada a 229 nm i es va enregistrar el seu espectre d'emissió entre 290 nm i 600 nm. Es van corregir els efectes de dilució de les dades obtingudes mitjançant el programa GRAMS 32 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

5. Conclusions

5.1. Conclusions generals

- ✓ S'han caracteritzat les proteïnes i els oligonucleòtids utilitzats en aquest treball mitjançant ESI-TOF MS, i s'han obtingut els corresponents espectres de les espècies inicials.
- ✓ S'han caracteritzat els oligonucleòtids com a model d'interacció amb ADN, la doble cadena formada entre ells, mitjançant ESI-TOF MS.
- ✓ S'ha estudiat la interacció dels diferents complexos amb les diferents proteïnes escollides, mitjançant ESI-TOF MS.
- ✓ S'ha estudiat la interacció dels diferents complexos amb els oligonucleòtids utilitzats, mitjançant ESI-TOF MS.

5.2. Conclusions de la interacció dels complexos

- ✓ El complex **1**, cisplatí, interacciona tant amb les proteïnes com amb els oligonucleòtids de manera molt important, fins i tot a relacions molars Pt:proteïna molt baixes, indicant la seva elevada reactivitat, i explicant així els efectes secundaris observats en la seva administració.
- ✓ El complex **2**, [Pt(dmba)(aza-N1)(dmso)], reacciona amb les proteïnes de manera molt particular. Quan aquest complex interacciona amb lligands proteics que contenen S-donadors, allibera el lligand dmso per enllaçar-se. Per contra, quan interacciona amb lligands N-donadors, allibera el lligand azaindolat. La interacció del complex amb els oligonucleòtids, i per extensió amb l'ADN, té lloc un cop s'ha perdut el lligand azaindolat, indicant així la unió a algun nitrogen de les bases nitrogenades.
- ✓ El complex **3**, [Pt(dmba)(N9-9AA)(PPh₃)]⁺, no interacciona amb aquelles proteïnes riques en sofre com el citocrom C o la metal·lotioneïna, i reacciona feblement amb mioglobina i albúmina perdent el lligand 9-aminoacridina. No s'ha observat una forta interacció covalent de **3** amb els oligonucleòtids, però sí que s'ha demostrat, per fluorescència, la presència d'una forta interacció π - π entre DS i **3**, la qual justificaria la seva activitat antitumoral.
- ✓ La baixa reactivitat dels complexos **2** i **3** amb les proteïnes en comparació amb el complex **1**, cisplatí, i el fet que **2** i **3** presentin una elevada interacció amb els oligonucleòtids com l'ADN, fan d'aquests dos complexos uns grans candidats per a prosseguir el seu estudi com a possibles drogues antitumorals.

6. Bibliografia

- [1] National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/>
- [2] American Cancer Society. <http://www.cancer.org/Treatment/TreatmentsandSideEffects/TreatmentTypes/index>
- [3] Lippert, B. Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug, 1st ed.; Helvetia Chimica Acta/Wiley-VCH: In Zurich/Weinheim, **1999**, 576.
- [4] Jakupec, M. A.; Galanski, M.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Keppler, B. K. *Dalton Trans.*, **2008**, 183-194.
- [5] Harper, B.W.; Krause-Heuer, A.M.; Grant, M.P.; Manohar, M.; Garbutcheon-Singh, K.B.; Aldrich-Wright, J.R. *Chem.--Eur. J.*, **16**, **2010**, 7064-7077.
- [6] Peyrone, M.; *Ann. Chem. Pharm.*, **51**, **1844**, 1-29.
- [7] Knipp, M.; Karotki, A. V.; Chesnov, S.; Natile, G.; Sadler, P. J.; Brabec, V.; Vasak, M. *J. Med. Chem.*, **50**, **2007**, 4075-4086.
- [8] Huska, D.; Fabrik, I.; Baloun, J.; Adam, V.; Masarik, M.; Hubalek, J.; Vasku, A.; Trnkova, L.; Horna, A.; Zeman, L.; Kizek, R. *Sensors*, **9**, **2009**, 1355-1369.
- [9] Wang, D.; Lippard, S.J. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **4**, **2005**, 307-320.
- [10] Perez, R.P. *Eur J Cancer*, **34** (10), **1998**, 1535-1542.
- [11] Paolicchi, A.; Lorenzini, E.; Perego, P.; Supino, R.; Zunino, F.; Comporti, M.; Pompella, A. *Int. J. Cancer*, **97**, **2002**, 740-745.
- [12] Sherman, S.E.; Gibson, D.; Wang, A. H.-J.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, **1988**, 7368-7381.
- [13] Kelland, L. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, **2007**, 573-584.
- [14] Wang, D.; Lippard, S.J. *Nat. Rev. Drug Discovery*, **4**, **2005**, 307-320.
- [15] Egger, A.E.; Hartinger, C.G.; Hamidane, H.B.; Tsybin, Y.O.; Keppler, K.; Dyson, P.J. *Inorg. Chem.*, **47**, **2008**, 10626-10633.
- [16] Montero, E.I.; Benedetti, B. T.; Mangrum, J.B.; Oehlsen, M.J.; Qu, Y.; Farrell, N.P. *Dalton Trans.*, **2007**, 4938-4942.
- [17] Press Release: The Nobel Prize in Chemistry 2002". The Nobel Foundation. 2002-10-09. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/press.html [Juliol 2012]
- [18] Bednarski, P.J.; *J. Inorg. Biochem.*, **60**, **1995**, 1-19.
- [19] Zhao, T.; King, F.L. *J. Inorg. Biochem.* **104**, **2010**, 186-192.
- [20] Ruiz, J.; Rodriguez, V.; de Haro, C.; Espinosa, A.; Perez, J.; Janiak, C. *Dalton Trans.*, **39**, **2010**, 3290-3301.
- [21] Ruiz, J.; Lorenzo, J.; Vicente, C.; López, G.; López-de-Luzuriaga, J.M.; Monge, M.; Avilés, F.X.; Bautista, D.; Moreno, V.; Laguna, A. *J. Inorg. Chem.*, **47**, **2008**, 6990-7001.
- [22] Kumar, P.; Kumar, R.; Prasad, D.N. *Arabian Journal of Chemistry*, **2011**, doi:10.1016/j.arabjc.2011.03.003.
- [23] Chen, K.-X.; Gresh; N.; Pullman, B. *FEBS Lett.*, **224** (2), **1987**, 361-364.
- [24] Castillo-Busto, M. E.; Meija, J.; Montes-Bayón, M.; Sanz-Medel, A. *J. Proteomics*, **9**, **2009**, 1109-1113.
- [25] Neault, J.F.; Tajmir-Riahi, H.A. *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer*, **1384**, **1998**, 153-159.
- [26] Peleg-Shulman, T.; Najajreh, Y.; Gibson, D. *J. Inorg. Biochem.*, **91**, **2002**, 306-311.
- [27] Fanali, G.; di Masi, A.; Trezza, V.; Marino, M.; Fasano, M.; Ascenzi, A. *Molecular Aspects of Medicine*, **33**, **2012**, 209-290.
- [28] Suntharalingam, K.; Vilar, R. *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. A*, **107**, **2011**, 339-358.
- [29] Cols, N.; Romero-Isart, N.; Capdevila, M.; Oliva, B.; González-Duarte, P.; González-Duarte, R.; Atrian, S. *J Inorg Biochem.*, **68**, **1997**, 157-166.

Annex

Taula I. Espectres de ESI-MS inicials de les proteïnes emprades en tampó de bicarbonat d'amoni 25 mM a pH7. Albúmina de sèrum humà, transferrina bovina (ambdues proteïnes majoritàries del corrent sanguini), mioglobina (com a model d'hemoglobina, proteïna present en els glòbuls vermells), la isoforma MT1 de metal·lothioneïna de mamífer (proteïna intracel·lular que es troba en la forma Zn₇-MT1) i citocrom C (proteïna present als mitocondris). En la primera columna es mostren els espectres dels diferents pics d'estat de càrrega, i a la columna de la dreta s'amplien aquests pics.

Albúmina PM calc.(mitja): 66500 Da PM isoformes: 66443 Da 66502 Da 66561 Da 66618 Da		
Transferrina PM calc.(mitja): 78019 Da		
Mioglobina PM calc.: 17567 Da		
Metal·lothioneïna PM calc.: 6605.9 Da (Zn ₇ -MT1) 6162.2 Da (apo-MT1)		
Citocrom C PM calc.: 12359 Da		

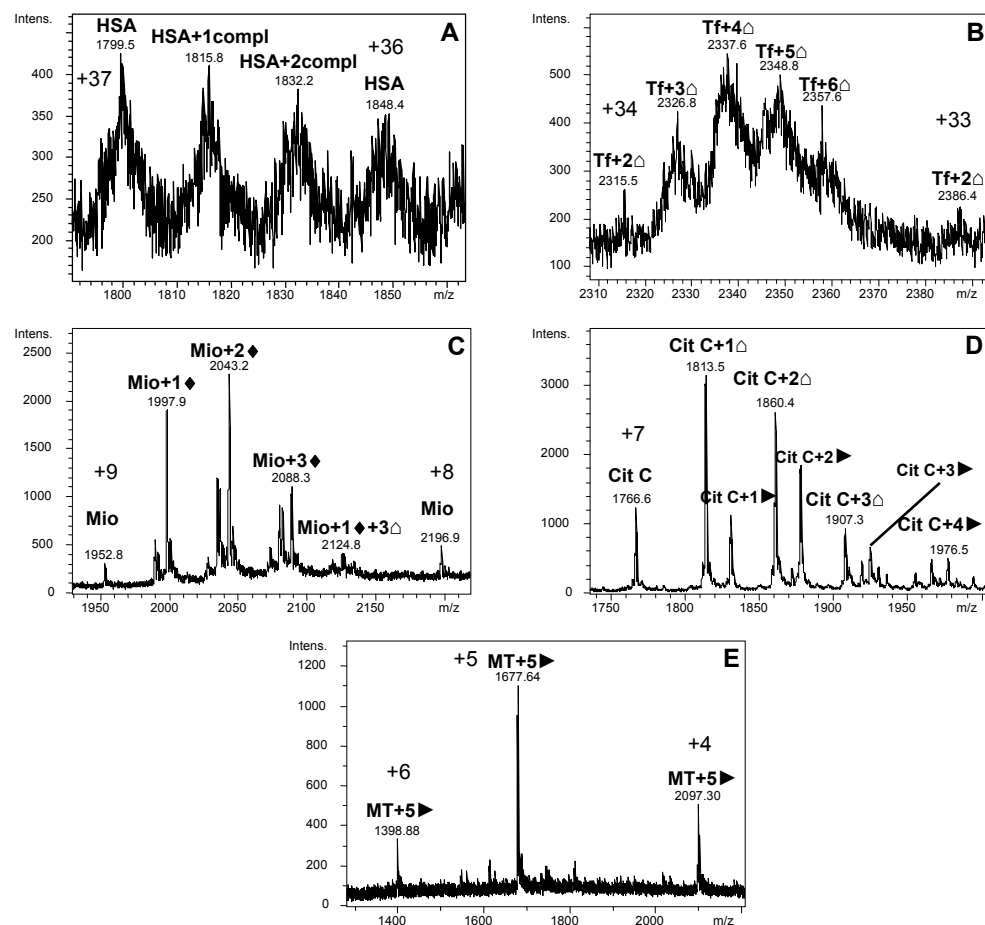


Figura 1. Espectres de ESI-MS obtinguts després de la incubació (24 h a 37 °C) del complex **2** amb (A) Albumina (HSA), (B) Transferrina (Tf), (C) Mioglobina (Mio), (D) Citocrom C (Cit C) i (E) Isoforma MT1 de metal·lotioneïna de mamífer, a una relació 1:10 (proteïna:Pt). El símbol "♦" indica l'addició de 407.4 unitats de massa, corresponent al complex quan ha eliminat el lligand azaindolat ($C_{13}H_{10}N_2$) (117.4). El símbol "►" indica l'addició de 446.4 unitats de massa, corresponent al complex quan ha eliminat el lligand dmso (78.1). I el símbol "△" indica l'addició de 329.0 corresponen a l'addició d'un complex quan ha eliminat el lligand azaindolat i el dmso.

